

ÉTUDE DU POUVOIR IMMUNOSTIMULANT D'UN EXTRAIT PHÉNOLOSOLUBLE DE NEISSERIA MENINGITIDIS

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard de Lyon

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 14 février 1980

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Jacques CORDEL

né le 5 juin 1955

à Oullins (Rhône)





PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON.

DIRECTEUR: Monsieur le Professeur COTTEREAU
DIRECTEURS HONORAIRES: Messieurs les Professeurs
TAPERNOUX, FLORIO, FROGET.

PROFESSEURS:

-Alimentation:	M. WOLTER
-Anatomie:	M. BARONE
-Chirurgie:	M. COULON
-Histologie-Anatomie pathologique:	M. TISSEUR
-Hygiène et industrie des aliments d'origine animale:	M. CHANTEGRELET
-Maladies contagieuses:	M. JOUBERT
-Parasitologie:	M. EUZEBY
-Pathologie générale-Microbiologie:	M. OUDAR
-Pathologie médicale du bétail:	M. COTTEREAU
-Pathologie médicale des équidés:	M. FONTAINE
-Pathologie de la reproduction:	M. BERTRAND
-Pharmacie-Toxicologie:	M. LORGUE
-Physiologie:	M. BOST
-Physique-Chimie:	M. DELATOUR
-Zootechnie:	M. FROGET

PROFESSEURS SANS CHAIRE:

MM. BOIVIN, DESCHANEL, GASTELLU, JEAN-BLAIN, LAPRAS, Mlle LAVAL,
MM. LE NIHOUANNEN, PRAVE.

MAITRES-ASSISTANTS AGREGES:

MM. FRANCK, KECK.

MAITRES ASSISTANTS:

MM. BELLI, Mme CHAUVE, Mlle COURSAT, MM. DEMONT, DESCOTES, EUZEBY,
FAU, GARNIER, GEVREY, GOUY, LEGEAY, NEYRET, Mme RACHAIL, M. RICHARD.

ASSISTANTS:

MM. BENOIT, BEZEAUD, Mme CHAPPUIS, MM. CHARLET, CHOMEL, DENOIX, Mlle
FAUBLEE, MM. FOURNEL, FRESNAY, GENIN, Mme HACHLER, MM. JAUSSAUD, LE
FOURNIER, MAY, NGO TAN HUNG, THIEBAULT, THIEVENAZ.

EXAMINATEURS DE LA THESE:

=====

PRESIDENT: M. le Professeur BERTOYE,
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie,
PREMIER ASSESSEUR: M. le Professeur FONTANGES,
du Centre de Recherches du Service de Santé
des Armées,
DEUXIEME ASSESSEUR: M. le Professeur OUDAR,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire,
TROISIEME ASSESSEUR: M. le Professeur PRAVE,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

L'Université Claude Bernard (Médecine-Pharmacie) de Lyon et l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon déclarent que les opinions émises dans les dissertations
qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs
et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur BERTOYE,
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Lyon,

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la Présidence
de notre Jury de Thèse.

Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre
reconnaissance et de notre profond respect.

A nos juges,

Monsieur le Médecin Chef des Services FONTANGES,
Maître de Recherches au Centre de Recherches du
Service de Santé des Armées,
Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard,
Chef de la Division de Microbiologie du Centre
de Recherches du Service de Santé des Armées,

que nous remercions d'avoir bien voulu nous confier ce travail.
Nous lui sommes reconnaissant de la bienveillante attention, de
la compréhension et du dynamisme dont il nous a entouré.

Monsieur le Professeur OUDAR,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

qui a bien voulu s'intéresser à notre travail et a accepté
de le juger,

Monsieur le Professeur PRAVE,
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

qui s'est penché sur notre travail et a accepté de le juger.

Nous souhaitons qu'ils trouvent ici l'expression de notre
profonde gratitude.

A Monsieur le Pharmacien Chimiste Principal IVANOFF,
Chef du Laboratoire des Aérosols au Centre de recherches
du Service de Santé des Armées,

dont les conseils et la compétence nous ont guidé dans la
réalisation de ce travail,

A tous ses collaborateurs du Laboratoire des Aérosols,

Nos sincères remerciements.

Nous remercions très respectueusement

Monsieur le Médecin Général,
Directeur du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées,

Monsieur le Directeur
des Recherches et des Moyens d'Essais,

qui nous ont permis la réalisation de cette thèse.

ETUDE DU POUVOIR IMMUNOSTIMULANT
D'UN EXTRAIT PHENOSOLUBLE DE
NEISSERIA MENINGITIDIS.

par JACQUES CORDEL.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
<u>Chapitre premier</u> - Les antigènes de la membrane externe de la paroi de Neisseria meningitidis..	3
-Introduction:Neisseria et Neisseriaceae....	3
-Structure de N. meningitidis	4
-Les antigènes	5
A-Antigènes polysaccharidiques	5
B-Antigènes protéiques	9
C-Antigènes lipopolysaccharidiques	11
D-Sérotypes	11
E-Ribosomes	14
 <u>Chapitre second</u> - Les immunostimulants non spé- cifiques d'origine bactérienne	17
-Généralités	17
-Les immunostimulants d'origine bactérienne.	19
1/Mycobactéries	19
2/Corynebactéries	20
3/Listeria monocytogenes	21
4/Brucelles	22
5/Bordetella	22
6/Klebsiella pneumoniae	23
7/Nocardia opaca	23
8/LPS des bacilles Gram -	23
9/Entérobactéries	24
10/Toxine cholérique	24
11/Préparations ribosomales	24
 <u>DEUXIEME PARTIE</u>	
<u>Chapitre premier</u> - Matériels et méthodes	27
I- Les animaux	27
II-Le produit	27

III-Etude du pouvoir protecteur	28
A-Différentes voies de stimulation	28
B-Différents types d'épreuves	32
C-Organigramme	34
IV- Etude de l'immunité cellulaire	35
A-Plages de lyse	35
B-Epuration du carbone colloïdal	37
C- M I F	40
D-Activité des macrophages alvéolaires ..	42
 <u>Chapitre second - Résultats</u>	 47
I- Pouvoir protecteur	47
II- Etude granulométrique des aérosols	54
III- Etude au niveau cellulaire	57
 <u>TROISIEME PARTIE</u>	
Discussion	65
Conclusion	68
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 69

INTRODUCTION.

On sait, depuis longtemps, stimuler la réponse immunitaire spécifique. Depuis les travaux de Jenner sur la variolisation, depuis les découvertes de Pasteur, la vaccination a fait des progrès considérables, aussi bien du point de vue de la connaissance et de la qualité des vaccins que du point de vue de leur champ d'application.

Le développement des travaux sur l'immunité non spécifique, en particulier en cancérologie, représente une nouvelle étape dans la recherche de la protection. Dans ce cas on ne cherche plus à stimuler la réponse du système immunitaire vis à vis d'un antigène précis, mais on cherche à stimuler l'organisme afin qu'il soit capable de réagir efficacement contre le plus grand nombre d'agresseurs.

L'extrait phénosoluble de *Neisseria meningitidis*, qui a fait l'objet de cette étude, appartient à cette classe d'immunostimulants non spécifiques.

Le travail que nous avons réalisé a été divisé en trois parties:

- la première consiste en une étude bibliographique. Celle-ci est elle-même divisée en une revue générale sur les différents immunostimulants d'origine bactérienne et en un rappel sur les antigènes de paroi de *Neisseria meningitidis*;

- la deuxième présente les matériels et méthodes utilisés, ainsi que les résultats obtenus;

- la troisième partie correspond à la discussion de ces résultats.

P R E M I E R E P A R T I E

CHAPITRE PREMIER.

LES ANTIGENES DE LA MEMBRANE EXTERNE DE LA PAROI DE NEISSERIA MENINGITIDIS.

INTRODUCTION: NEISSERIA ET NEISSERIACEAE.

La famille des Neisseriaceae regroupe des diplo-coccobacilles à coloration de Gram variable, mais le plus souvent négative. On distingue quatre genres:

- le genre Moraxella (ex. Moraxella du groupe I),
- le genre Actinobacter (ex. Moraxella du groupe II) qui était classé dans les bacilles Gram négatif),
- le genre Branhamella (ex. Neisseria catarrhalis) (20) que son GC% de 40 au lieu de 50 a fait retirer du genre Neisseria,
- et le genre Neisseria.

Le genre Neisseria constitue un groupe hétérogène qui rassemble différentes espèces, pathogènes ou non.

Les deux espèces pathogènes sont:

-N. meningitidis, agent de la méningite cérébro-spinale, divisée par réaction d'agglutination en différents groupes sérologiques: A, B, C, D, X, Y, et Z. Cette variation antigénique concerne seulement une petite partie du génome (80).

-N. gonorrhoeae, agent de la gonococcie. Environ 80% de son génome est commun avec celui de N. meningitidis (80, 81).

A côté de ces espèces pathogènes, on distingue différentes espèces saprophytes: N. lactamica, la plus fréquente, N. flava et N. sicca. N. lactamica pourrait immuniser contre N. meningitis, groupe A (56).

Cette séparation en deux ensembles, pathogènes et non

pathogènes est confirmée par l'étude de la formation d'hybrides à partir de deux hélices hétérologues d'ADN (80). En pourcentage de l'hybridation homologue, on a :

N. meningitidis X N. gonorrhoeae :	80 %
N. meningitidis X N. saprophytes :	30 à 60 %

A titre de comparaison, on peut indiquer :

Branhamella (ex-N. catarrhalis) X N. saprophytes : 10 à 22 %.

Au cours de l'étude que nous avons entreprise, nous nous sommes intéressé seulement à *Neisseria meningitidis*.

STRUCTURE DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*.

Toutes les *Neisseria*, pathogènes ou non, ont la même structure :

- un noyau volumineux, formé de la réunion de faisceaux torsadés d'ADN, souvent entouré de granules de polyphosphates;
- un cytoplasme et une membrane cytoplasmique trilamellaire de 80 Å d'épaisseur, sans grande particularité;
- une paroi formée de deux couches :

- une couche externe, ondulée, à structure trilamellaire de membrane unitaire, apparaissant formée en surface par la juxtaposition de projections en doigts de gants d'une largeur de 240 à 320 Å ,

- une couche interne, rigide et homogène, d'épaisseur 32 à 40 Å , identifiée comme étant une couche de muréine, polymère polysaccharidique contenant des ponts oligopeptidiques.

A l'aide de méthodes douces, il est possible d'extraire de la paroi du méningocoque un "complexe naturel de paroi", lequel peut provenir aussi bien de bactéries complètes que du milieu de culture (135).

Ce complexe comprend quatre constituants essentiels :

- une fraction polysaccharidique (4 à 10% de l'ensemble),
- une fraction protéique (45 à 65% de l'ensemble),
- une fraction lipopolysaccharidique (10 à 25 % de l'ensemble),

-une fraction lipidique (15 à 30% de l'ensemble).

Le complexe est immunogène chez le lapin et provoque l'apparition d'anticorps anti-protéine, anti-lipopolysaccharide et anti-polysaccharide. La fraction protéique isolée est immunogène et entraîne l'apparition d'anticorps spécifiques de type. La fraction lipopolysaccharidique isolée possède les propriétés chimiques et biologiques des endotoxines bactériennes.

Ce complexe représente certainement la membrane externe trilamellaire de la paroi du méningocoque dans son état naturel.

LES ANTIGENES DE SURFACE DE LA PAROI DE NEISSERIA

MENINGITIDIS.

Le complexe naturel de paroi de Neisseria meningitidis associe donc trois grandes classes d'antigènes:

- des polysaccharides,
- des protéines,
- et des lipopolysaccharides.

Nous allons étudier successivement chacun de ces antigènes avant d'envisager à la fin de ce chapitre l'activité immunologique d'autres antigènes, les ribonucléoprotéines de Neisseria meningitidis.

A - Antigènes polysaccharidiques.

1°) propriétés physico-chimiques.

a) selon Liu et coll. (85,86):

Les polysaccharides méningococciques peuvent être extraits aussi bien du milieu de culture de Neisseria meningitidis que des bactéries elles-mêmes. Cependant, bien que constitués des mêmes monomères dans les deux cas, les polymères les plus longs proviennent du milieu et non pas de la masse cellulaire (57).

Les polysaccharides extraits des méningocoques des

groupes A,B et C sont des homopolymères d'un poids moléculaire supérieur à 100 000 daltons pour les groupes A et B,et supérieur à 400 000 daltons pour le groupe C (85, 86).

Le polysaccharide du groupe A a pour monomère le D-mannosamine-phosphate,partiellement N. et O. acétylé,de formule: $C_6 H_{19} NO_9$. Ces polysaccharides sont différents entre eux tant du point de vue chimique qu'immunologique. En effet,le polysaccharide C contient des groupements N. et O. acétylés alors que le polysaccharide B ne contient que des groupements O. acétylés.D'autre part,le polysaccharide C est plus sensible à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique méthanolique et est plus résistant à l'action de la neuraminidase.Enfin,le polysaccharide B est formé de chaînes de 72 monomères,pour un P M total de 21 000 daltons,alors que le polysaccharide C est formé de 10 chaînes de 143 monomères chacune (86).

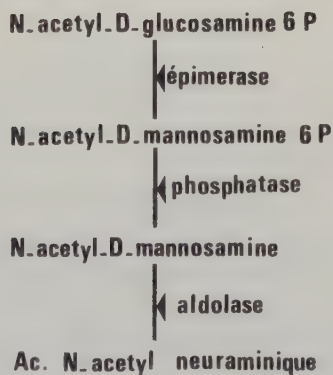
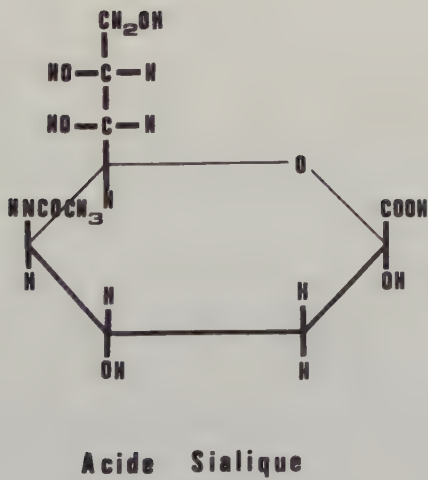
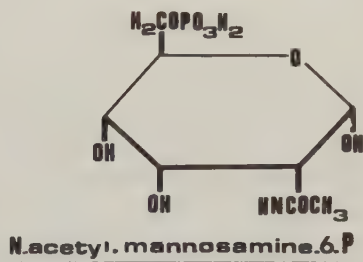
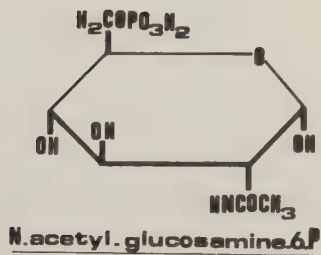
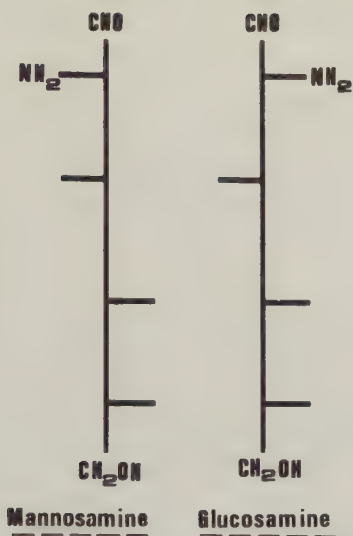
Dans les trois groupes,les monomères proviennent de voies de synthèse très voisines.En effet,on a pu démontrer que dans le groupe C,le N-acétyl-D-mannosamine est un précurseur immédiat de l'acide N-acétyl-neuraminique (acide sialique).

On trouve également des polysaccharides de haut poids moléculaire chez les méningocoques des groupes X et Y, mais ils ne semblent pas contenir des acides sialiques ou même leurs précurseurs.De plus,ce ne sont pas obligatoirement des homopolymères (2,3).

b) selon Prost (109):

Les polyosides de groupe se répartissent en deux ensembles,le premier qui réunit les groupes A,D,X,Z et dont les constituants sont représentés par des osamines et du phosphore,le deuxième qui comprend les groupes B, C,Y et dont les constituants sont des osamines,du phosphore et de l'acide sialique.

Le polysaccharide du groupe A est une poly-N-acétyl-glucosamine-6-phosphate.Les groupements phosphoryls sont unis par des liaisons phosphomonoesters à un hydroxyle



Voie de synthèse de
l'acide sialique chez
N. meningitidis.

du résidu osaminyl. L'absence de liaisons phosphodiesters implique que le polymère est très ramifié. La longueur moyenne de la chaîne est de 6 résidus. Le nombre de ramifications pour l'ensemble du polymère (de P M 133 000) est estimé à 80 ramifications de 3 résidus osaminyls. Enfin il ne semble pas exister de groupements O-acétyl.

Les polysaccharides des groupes B et C sont des copolymères d'acide sialique et d'hexosamine (glucosamine dans le groupe B, mannosamine dans le groupe C).

2°) propriétés immunologiques.

La classification habituelle de *Neisseria meningitidis* repose sur des réactions d'agglutination mettant en cause l'antigène polysaccharidique. Cet antigène a une spécificité de groupe. On peut ainsi distinguer 7 groupes: A, B, C, D, X, Y, Z.

Les polysaccharides extraits des méningocoques des groupes A et C sont immunogènes chez l'homme (57, 58). Pour ce qui est du groupe C, l'antigène polysaccharidique a même une efficacité reconnue en tant que vaccin anti-méningococcique chez l'adulte jeune. En effet, l'injection de polysaccharide C par voie sous-cutanée ou intradermique provoque l'apparition de taux élevés et persistants d'anticorps (5, 8). De plus, ce titre élevé en anticorps correspond à l'acquisition d'une protection (55, 56). Ainsi on a pu diminuer par un facteur de 2 ou 3 le taux d'infection par le méningocoque du groupe C (4). Cette efficacité a été confirmée par des campagnes de vaccination sur le terrain (4, 52).

Le polysaccharide du groupe A provoque également une réponse en anticorps importante (7). Du point de vue de l'effet protecteur, les premiers essais ont cependant été décevants (117). Des essais plus récents ont conclu à l'efficacité du vaccin polysaccharidique pour le groupe A (7, 33, 118).

Le polysaccharide du groupe B a posé et pose encore actuellement un problème. Bien que très proche du polysaccharide C du point de vue chimique, il est très peu immunogène (77, 132). Même dans les méningites à méningocoques

du groupe B, le taux en anticorps anti-polysaccharide reste bas (136), ce qui conduit à penser que la réponse immunitaire à l'infection par le méningocoque est en partie dirigée contre des antigènes autres que le polysaccharide (56). Plusieurs hypothèses ont été posées pour tenter d'expliquer cette défaillance dans la réponse immunitaire du polysaccharide B:

- ou bien cet antigène est rapidement dégradé dans l'organisme par la neuraminidase, et cette dégradation est suffisante pour empêcher la stimulation des structures immunitaires concernées: cette hypothèse a pu être démontrée chez la souris, mais non chez l'homme (75);

- ou bien l'antigène, assez proche par sa structure chimique d'un antigène de surface de l'érythrocyte des mammifères, bénéficie d'une tolérance immunitaire.

Bien que le mécanisme ne soit pas encore totalement expliqué, on a pu remarquer, lors de récents essais d'un vaccin protéique contre *N. meningitidis* groupes B et C, que les anticorps bactéricides anti-B qui apparaissaient étaient dirigés non pas contre l'antigène protéique, mais contre le polysaccharide B (138). On peut donc penser à une synergie entre protéine et polysaccharide.

La nature de la stimulation induite par les antigènes polysaccharidiques de *N. meningitidis* est en revanche bien connue. On observe d'abord une réponse humorale qui met en jeu des Ig M, puis dans un second temps des Ig G et des Ig A, tandis que le taux en Ig M reste élevé (6). Un rappel, quelques semaines ou quelques mois après la primo-injection, est inefficace (5). La protection met en oeuvre à la fois des opsonines (114) et des anticorps bactéricides (55, 56), en plus des macrophages et des défenses locales nasopharyngées. Ces résultats font envisager une stimulation des seuls lymphocytes B par les antigènes polysaccharidiques des méningocoques.

B - Antigènes protéiques.

Les protéines de la couche externe de la paroi de *Neisseria meningitidis* sont responsables d'une spécificité de type (46, 53). GOLD et coll. (54) ont d'abord identifié six

types antigéniques dans le groupe C. Un type supplémentaire a été ensuite identifié par KASPER et coll. (76). Dans le groupe B, FRASCH et CHAPMAN (44,46) ont isolé dix sérotypes. Plus récemment, ZOLLINGER et MANDRELL (137) ont identifié 18 sérotypes protéiques chez *Neisseria meningitidis* à l'aide d'un test radio-immunologique.

L'antigène protéique est, en fait, complexe. A côté d'une protéine ou d'un polypeptide qui en constitue le déterminant principal, on trouve environ quatre autres protéines secondaires, représentant d'autres sérotypes (46). Cette composition explique les réactions croisées que l'on peut mettre en évidence quand on étudie la réponse à l'antigène d'une souche protéique donnée (132). Ceci explique également l'existence de plusieurs sérotypes protéiques pour une souche unique.

Les malades atteints de méningococcie élaborent des anticorps hémagglutinants contre les antigènes protéiques. Les titres en anticorps anti protéine enregistrés dans les infections à germes du groupe B sont équivalents à ceux des infections à germes du groupe C (136).

En ce qui concerne l'effet protecteur, la diversité des types protéiques constitue un obstacle à l'utilisation des protéines de la couche externe de la paroi de méningocoque en tant que vaccin anti-méningococcique. Cependant, un sérotype unique (type 2), a été retrouvé dans un grand nombre de souches responsables d'épidémies de méningites, en particulier dans les souches du groupe B et C. Cette constatation est intéressante pour le groupe B, pour lequel la réponse anti-polysaccharidique est très faible. Ces observations ont conduit à effectuer des essais de protection avec un vaccin constitué par une protéine du type 2, seule ou associée au polysaccharide C (138). Les résultats ont été positifs chez la souris, vis à vis d'un méningocoque groupe B, type 2. Ce vaccin entraîne un taux élevé d'anticorps hémagglutinants et bactéricides anti B et anti C, ces anticorps possédant une spécificité de type. Si ce vaccin s'est également révélé efficace chez l'homme, en revanche, les anticorps qui apparaissent ont, assez curieusement, une spécificité de groupe; ils sont dirigés non pas contre les

protéines, mais contre les polysaccharides (138).

C - Antigènes lipopolysaccharidiques.

Le LPS méningococcique, de même que les LPS des autres bactéries Gram -, est constitué par:

- du phosphore, sous forme de groupements phosphates,
- des oses neutres dont un aldohéptose,
- des osamines,
- de l'acide 2-céto-3 désoxyoctonique (KDO),
- de l'éthanolamine
- et des acides gras.

Ce LPS peut se diviser en deux parties:

- une fraction polysidique
- et une fraction hydrophobe "lipidique": le lipide A.

Le polyside paraît constitué de plusieurs régions: la partie la plus interne est formée de KDO, d'heptose (et peut-être d'osamines), esterifiés par du phosphore. La partie externe est formée par des oses neutres et constitue l'équivalent de l'antigène somatique O des entérobactéries.

Le lipide A est constitué de phosphore, d'osamines, d'acides gras et d'une base azotée, l'éthanolamine.

A l'état naturel, on aurait en fait un complexe glucido-lipido-polypeptidique. Le polypeptide ayant 42 résidus, pour un poids moléculaire total de 5 332.

L'activité antigénique du lipopolysaccharides est bien établie (85). Il présente une spécificité de type (90). Huit types lipopolysaccharidiques ont pu être isolés (137). Il faut d'ailleurs noter que les réponses en anticorps anti-lipopolysaccharidiques sont aussi élevées pour les souches du groupe B que pour les autres groupes (137).

D - Sérotypes.

L'utilisation commune du typage protéique et du typage lipopolysaccharidique permet une identification précise des différentes souches de *Neisseria meningitidis* (137).

Il a été utilisé une combinaison de 18 types protéiques (P) et de 8 types lipopolysaccharidiques (L). Il est donc facile de définir une souche par sa combinaison "P.L". Des essais

TYPE SÉROLOGIQUE	PHOSPHORE	OSÉS NEUTRES	HEPTOSES	K D O	OSAMINES	ACIDES GRAS	ETHANOLAMINE
A	8,42	14,2	0,16	1	3,78	N.D.	N.D.
B	7,83	7,4	0,85	1	2,72	N.D.	N.D.
C	9,54	7,1	0,55	1	4,89	39	4,45
X	6,1	5,0	0,55	1	4,40	33	1,35

N.D.:non déterminé.

TABLEAU I: Constitution molaire générale des LPS
(d'après méningococciques (extraits par le phénol).
PAAKKANEN (100)) (La constitution molaire est exprimée en se rapportant à une mole de KDO pour chaque composé étudié).

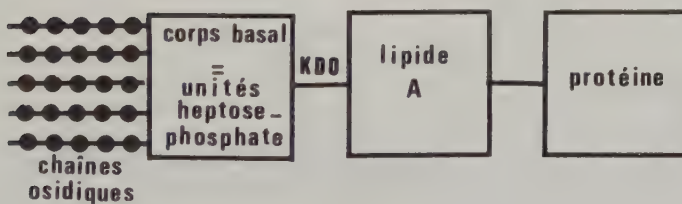


FIGURE 1: Structure générale du L.P.S.

Sérotype protéique par radio-immuno- logie.	Souche	Groupe sérologique	Mise en évidence par	Sérotype bactéricide	Sérotype par radio-immu- nologie Protéine	L P S
P1	60E	C	G-W	I	P1	L3, (4, 7)
P2	M986	B	F-C	2, 7	P2, 6	L3, (2, 7)
P3	126E	C	G-W	III	P3	L1, 8
P4	118V	C	G-W	IV, III	P4, 3	L2, 4
P5	35E	C	G-W	V	P5	L2
P6	32I	C	G-W	VI, IV, I	P6	L2, 4
P7	89I	C	W-R	VII, IV	P7, 4	L4
P8	190I	B	W-R	VIII	P8	L1, 3, 4, 7
P9	M982	B	F-C	9	P9	L7
P10	M1011	B	F-C	2, 10	P10, 6, 2	L3, (7)
P11	M1080	B	F-C	1	P11	L3, 4, 7, 8
P12	S3032	B	F-C	12	P12	L3, 7
P13	6940	B	W-R	XII, III	P13, (8)	L1
P14	M981	B	F-C	4	P14	L5
P15	M992	B	F-C	5	P15	L6
P16	M990	B	F-C	6	P16	L3, (7)
P17	6557	B	W-R	XI, III	P17	L1, 8, (7)
P18	M978	B	F-C	8, (1, 3)	P18	L8, 4, 7, (3)

G-W, GOLD et WLE (53); F-C, FRASCH et CHAPMAN (44); W-R, travaux du "Walter Reed Army Institute of Research".

Les parenthèses indiquent une inhibition comprise entre 50 et 69 % ; dans les autres cas, l'inhibition est supérieure ou égale à 70 %.

TABLEAU II : Classification des différentes souches de *Neisseria meningitidis* d'après les stéréotypes protéiques et lipopolysaccharidiques. (d'après ZOLLINGER (137)).

ont été réalisés sur 142 souches de méningocoques (137): 43 % des souches du groupe A, 22 % des souches du groupe B et 16 % de celles du groupe C n'ont pu être typées. Il faut remarquer, comme nous l'avons vu précédemment, qu'une souche peut posséder plusieurs types protéiques ou lipopolysaccharidiques. Cependant, cette méthode apparaît plus précise et plus complète que les typages à l'aide de réactions bactéricides (46,53).

E - Ribosome de Neisseria meningitidis.

Des ribosomes de *Neisseria meningitidis* groupe B ont été isolés par THOMAS et WEISS (124). Ces préparations contiennent principalement de l'ARN (66%), des protéines (24%), ainsi que d'autres constituants, mais en faible quantité. Ces ribosomes sédimentent comme des fractions pures, avec un coefficient de 66 unités Svedberg.

Après injection à la souris de telles préparations purifiées, on note une augmentation du nombre des PFC (plages de lyse). En revanche, la sensibilisation des érythrocytes par des quantités croissantes de surnageant de culture de méningocoque diminue le nombre de PFC. Le traitement des érythrocytes par la neuraminidase augmente le nombre des plages de lyse, alors que le traitement par la pronase le réduit. Ces résultats font penser que les anticorps sont dirigés contre un antigène polysaccharidique autre que l'acide sialique, lequel serait découvert par action de la neuraminidase et déplacé par la pronase après rupture d'une liaison peptidique sous-jacente.

D'autre part, les souris qui ont reçu des ribosomes de *N. meningitidis* sont protégées vis-à-vis des méningocoques du même groupe, mais aussi d'autres groupes. Cette immunogénicité n'est pas modifiée par la ribonucléase, mais est considérablement réduite par la pronase. La réponse immunitaire à ces ribosomes ne met donc pas en cause le polysaccharide de groupe.

Malgré ces résultats relativement encourageants, les recherches effectuées avec des antigènes ribosomiaux de méningocoques semblent abandonnées pour trois raisons, d'après

WEISS et HILL (130):

- les préparations de ribosomes de *N. meningitidis* sont relativement toxiques pour le lapin, peut-être à cause de résidus de LPS;

- la dose de produit nécessaire à la stimulation est trop importante;

- la réponse à cet antigène pourrait être accompagnée de la production d'anticorps dirigés contre des composants normaux de l'érythrocyte.

C

B

- 16 -

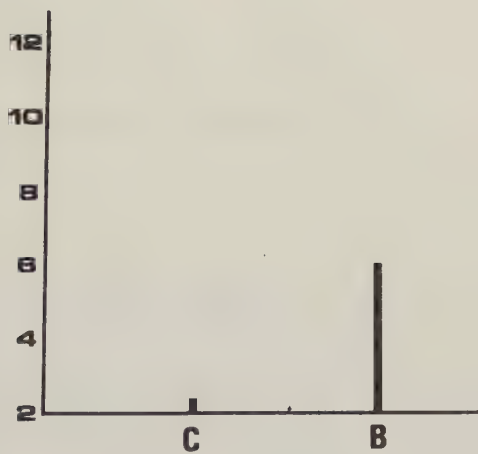
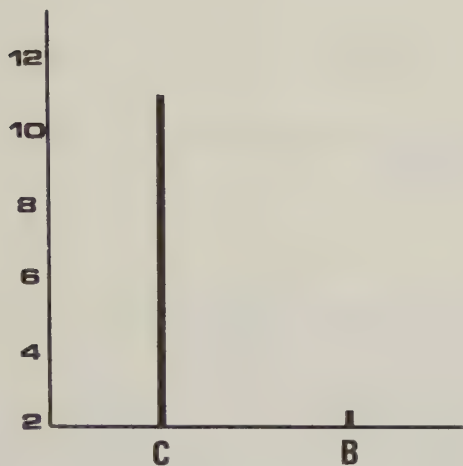
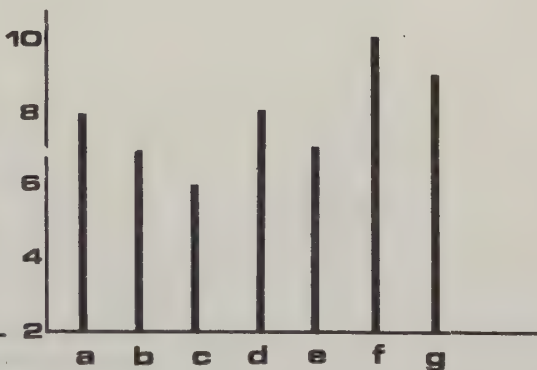
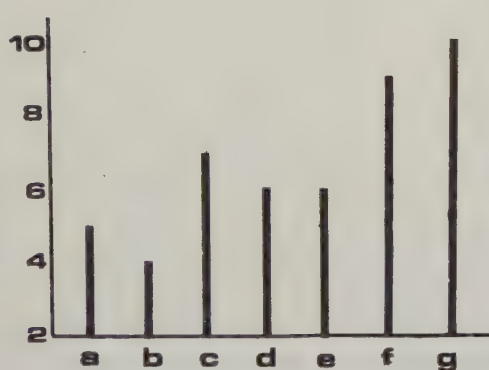
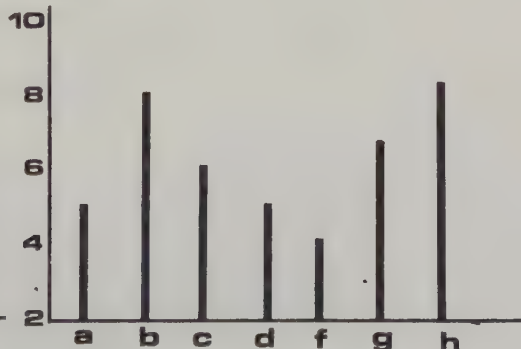
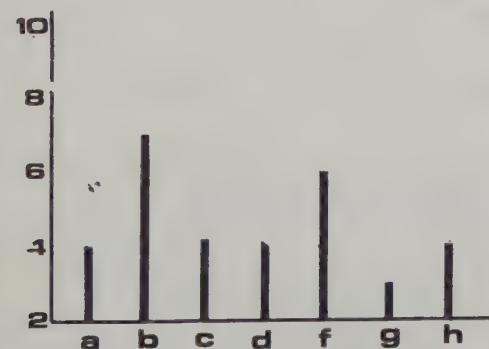
TITRE HA [$\cdot 10^6$ de la dilution du sérum]PolysaccharidesProtéinesLipopolysaccarides

FIGURE 2: Réponse, exprimée en Unités Hémagglutinantes, du sérum de deux convalescents de méningococcie, vis-à-vis d'antigènes polysaccharidiques, protéiques, et lipopolysaccharidiques. (D'après ZOLLINGER (136)).

CHAPITRE SECOND.

LES IMMUNOSTIMULANTS NON SPECIFIQUES D'ORIGINE BACTERIENNE.

GENERALITES: Intérêt de l'immunostimulation.

D'une manière générale, l'immunostimulation non spécifique permet de développer une réponse favorable de l'organisme vis-à-vis d'éléments qui lui sont étrangers.

En médecine humaine, l'utilisation la plus intéressante concerne la cancérologie. De nombreux agents immunostimulants d'origine bactérienne présentent en effet une action anti-tumorale ainsi que l'ont montré MATHE et de nombreux autres auteurs (91, 92, 51, 63, 65, 73, 107, 121, 122, 133). Cependant, les immunostimulants trouvent également des applications importantes dans le domaine des maladies infectieuses notamment du point de vue préventif.

En médecine vétérinaire, l'intérêt des immunostimulants augmente actuellement avec le développement des élevages industriels, qui, en concentrant de nombreux animaux dans des espaces restreints, favorisent le développement d'agressions qui font le jeu d'infections bactériennes ou virales. L'avenir dans ce domaine semble être l'immunostimulation collective plus que l'intervention individuelle, du moins tant que la prévention ne primera pas sur l'aspect curatif dans le secteur non industriel.

Historique.

Les premières observations sur la possibilité de modifier quantitativement la réponse immunitaire datent certainement de 1924 avec LEWIS et LOOMIS (84). Ces auteurs constatent que des cobayes qui ont reçu une injection intra-péritonéale de bacille tuberculeux présentent une meilleure réponse anticorps à des hématies de mouton. L'année suivante, RAMON (110) remarque que les chevaux produc-

teurs de sérum anti-diphtérique dont les taux en anticorps sont les plus élevés correspondent à ceux qui présentent un abcès au point d'injection de l'anatoxine. En utilisant du pus, de l'amidon, du tapioca, Ramon cherche alors à provoquer un afflux leucocytaire bénéfique. Les résultats obtenus lui permettent finalement d'avancer l'idée d'utiliser préférentiellement des vaccinations associées (111).

Depuis, l'immunostimulation et l'immunodépression ont été très étudiées. On a eu recours aussi bien à des produits extraits des bactéries qu'à des substances minérales (hydroxyde d'alumine) ou organiques, voire même à des produits purement synthétiques.

Un des adjuvants les plus connus et le plus souvent cité du point de vue expérimental est certainement l'adjuvant de Freund (47), lequel constitue une sorte de produit de référence.

Définitions.

Avant d'aborder l'étude bibliographique détaillée des immunostimulants, il est nécessaire de définir préalablement l'immunostimulant par rapport à l'adjuvant.

Selon MUNOZ (96), l'adjuvant est la substance, bénéfique du point de vue immunitaire, qui est injectée en même temps que l'antigène. Pour HALPERN (64), un adjuvant est une substance qui modifie l'antigène, alors qu'un immuno modulateur agit sur les cellules ou sur les récepteurs mis en jeu lors de la réponse immunitaire. Plus schématiquement, l'adjuvant modifie le projectile, alors que l'immunostimulant modifie la cible.

En pratique il est souvent difficile de faire une distinction marquée entre adjuvant et immunostimulant, certains produits ayant à la fois ces deux propriétés; l'adjuvant complet de Freund ou les endotoxines en sont des exemples typiques.

REVUE DES IMMUNOSTIMULANTS NON SPECIFIQUES D'ORIGINE
BACTERIENNE.

1°) Les mycobactéries.

Ce groupe a été très étudié. Les principales mycobactéries utilisées sont représentées par: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. chelonensis*, *M. phlei*.

Les mycobactéries peuvent être utilisées entières, soit tuées, soit vivantes. Parmi les premières, nous pouvons citer l'adjuvant de Freund (47) constitué de bactéries tuées et d'huile de paraffine, produit d'ailleurs plus adjuvant qu'immunostimulant. Le B.C.G., souvent utilisé vivant est, pour sa part, un immunostimulant vrai très efficace. Il augmente la résistance à l'infection par *Salmonella enteritidis* (HOWARD et coll. (69)), *Brucella abortus* (BEKIERKUNST et SULITZEANU (10)), *Klebsiella pneumoniae* (PARENT et coll. (101)), ou *Staphylococcus aureus* (DUBOS et SCHAEGLER (32)). MILLER et coll. (94) ont mis en évidence que l'inoculation de B.C.G. au niveau du bourrelet plantaire de la souris augmente la réponse immunitaire à l'injection d'érythrocytes de mouton. Cette réponse est représentée par l'augmentation du nombre de PFC au niveau du noeud lymphatique poplitée. Le B.C.G. augmente la résistance à différents virus (virus de l'encéphalomyocardite, herpes humain, grippe), comme l'ont montré FLOCH et WERNER (41). Il a également une action inhibitrice sur la croissance tumorale: il est utilisé par MATHE et coll. dans la thérapeutique des leucémies (91, 92). D'autre part, MACKANESS et coll. (89) ont montré que l'invasion généralisée de la souris par le B.C.G. entraîne une suppression de l'inhibition par la réponse immunitaire humorale des lymphocytes T sensibilisés.

Des extraits de mycobactéries sont également immunostimulants. Ainsi JACOBS et coll. (42) stimulent l'activité des cellules thymo-dépendantes par un extrait méthanolique de B.C.G. KUPERMAN et coll. (83) ont mis en évidence les propriétés antitumorales d'un extrait hydrosoluble et d'une fraction méthanol-insoluble, qui, en outre, stimule la réponse à des structures peptido-glucolipidiques allogènes.

Le Wax D de WHITE et coll. (131) -fraction de *Mycobacterium tuberculosis* extraite par le chloroforme, soluble dans l'éther, insoluble dans l'acétone stimule la production d'anticorps et entraîne une hypersensibilité retardée; il est aussi efficace que l'adjuvant de Freund.

Le W. S. A. (Water Soluble Adjuvant de ADAM et coll. (1)), extrait hydrosoluble de *M. smegmatis*, augmente considérablement la production d'anticorps et entraîne une hypersensibilité retardée chez la souris. JUY et CHEDID (73) ont montré que cette même fraction inhibe le développement des mastocytomes.

Le Cord Factor protège la souris contre une infection par *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (PARENT et coll. (105)). D'autre part, après injection de cette fraction dans le coussinet plantaire de la souris, BEKIERKUNST et coll. (11) notent une augmentation de la réponse immunitaire aux érythrocytes de mouton.

Le muramyl dipeptide, analogue structural de synthèse d'une fraction de peptidoglycane de la paroi de mycobactéries, protège la souris (CHEDID et coll. (22)) et le sourisceau (PARANT et coll. (104)) contre *Klebsiella pneumoniae*. Il a d'autre part, pour JUY et CHEDID (73), une action antitumorale marquée.

En ce qui concerne le niveau d'action de ces immunostimulants, il semble, d'après les travaux de MACKANESS et coll. (83), que les mycobactéries et leurs extraits agissent sur la phagocytose via les macrophages, alors que le B.C.G. agirait plutôt sur les lymphocytes T.

Enfin, nous pouvons noter que les ribosomes de ces mêmes mycobactéries augmentent la réponse immunitaire de la souris à la sérumalbumine bovine (YOUMANS et YOUMANS (134)) et pourraient même induire une encéphalite allergique auto-immune (GUMBINER et coll. (60)), ce qui démontre leur pouvoir immunostimulant.

2°) Les corynebactéries.

Le genre *Corynebacterium* représente un autre groupe important d'immunostimulants.

PREVOT (108) a montré que, chez la souris, après inoculation intra-veineuse, ces bactéries sont rapidement capturées

par les cellules du système réticulo-endothélial, provoquant ainsi une hyperplasie des organes lymphoïdes. RAYNAUD et coll. (112) ont mis en évidence le puissant pouvoir immunostimulant des espèces *parvum*, *anaerobium* et *granulosum*. En particulier, *C. parvum* stimule l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial (HALPERN et coll. (62)). De plus, pour DIMITROV et coll. (29)), cette espèce exerce une action stimulante au niveau de l'hématopoïèse et de la myélogenèse et une action favorable contre les agents myélosuppresseurs. En outre, *C. parvum* augmente chez la souris le pouvoir bactéricide vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* (FAUVE et HEVIN (37)). Des substances hydrosolubles à effet immunostimulant ont d'ailleurs été extraites de ces mêmes bactéries, délipidées, par MIGLIORE SAMOUR et coll. (93). Leur pouvoir immunostimulant a été démontré par l'augmentation du nombre des PFC, par l'accélération de la vitesse d'épuration du carbone colloïdal, par une formation accrue d'anticorps anti-influenza.

Les corynebactéries protègent la souris contre *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* (PARANT et coll. (101, 105)). Pour SCOTT et MARTIN, ce sont des agents antitumoraux efficaces, qui agissent aussi bien par voie générale (121) que par voie locale (122). Ainsi, *C. parvum* tue à une action efficace contre la tumeur d'Ehrlich et le sarcome T de Betz (HALPERN et coll. (63)).

Pour HALPERN et coll. (63) et SLJIVIC et WATSON (123), l'action immunostimulante des corynebactéries s'exerce essentiellement sur les réactions à médiation cellulaire. SLJIVIC et WATSON (123) et SCOTT et MARTIN (122) pensent qu'il y a activation des macrophages; ce résultat nécessite la médiation des lymphocytes T (123), lesquels sont inhibés (122). HOWARD et coll. (70) attribuent un rôle aux lymphocytes B.

3°) Listeria monocytogenes.

L'injection de *L. monocytogenes* provoque l'apparition d'une immunité spécifique, par l'intermédiaire des macrophages (FAUVE et coll. (35)). A côté de cette immunité spécifique, il se développe également une stimulation non spé-

cifique comme l'ont montré YODIM et coll. (133) par l'inhibition de la croissance d'une tumeur. De plus, chez la souris qui a reçu une dose subléthale de *Listeria*, les macrophages péritonéaux présentent une sensibilité diminuée à l'infection par *Brucella melitensis* et *Corynebacterium kutscheri* (FAUVE et coll. (36)). PETIT et UNANUE ont injecté par voie intra-péritonéale des produits issus du liquide de culture de *Listeria monocytogenes*; ces substances ont un effet mitogène sur les lymphocytes B tout en produisant une activation des macrophages. De plus la souris ainsi traitée développe un état transitoire de résistance non spécifique à *L. monocytogenes*.

Enfin, BAKER et CAMPBELL (9) ont signalé que des fractions de paroi de *L. monocytogenes* provoquent une baisse de résistance aux infections.

4°) Les brucelles.

TOUJAS et coll. ont injecté à la souris une bactérie inactivée, *Brucella abortus* souche B₁₉ et un sérum hyperimmun. Ils ont constaté une stimulation de la réponse immunitaire contre les hématies de moutons. Ce phénomène est à son maximum quelques jours seulement après l'injection.

Brucella abortus a également une action contre la tumeur d'Ehrlich (PILET et SABOLOVIC (107)). De plus, un extrait de la même bactérie protège la souris contre le sarcome ostéogène murin grâce à une activation des macrophages (GLASGOW et coll. (51)).

5°) Bordetella.

D'autres parvobactéries, du genre *Bordetella*, peuvent stimuler le système immunitaire. Leur effet est cependant plutôt adjuvant qu'immunostimulant. Le premier, mis en évidence par FINGER et coll. (39), se traduit par une augmentation de la production des hémolysines et des hémagglutinines ainsi que par une augmentation des réponses primaires et secondaires. Mais *Bordetella* a aussi une action de potentialisation des lymphocytes B (DRESSER et TAO (31)). Enfin, l'injection de *Bordetella pertussis* entraîne une augmentation de la production des Ig E (MOTA et coll. (95)).

6°) Klebsiella pneumoniae.

Un polysaccharide extrait par NAKASHIMA (97) de la capsule de *Klebsiella pneumoniae* a révélé des propriétés adjuvantes supérieures à celles de l'adjuvant de Freund; les réponses primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire qui suivent l'injection de sérumalbumine bovine sont augmentées après stimulation à l'aide d'un mélange polysaccharide capsulaire-sérumalbumine bovine.

En outre, ce même auteur a pu mettre en évidence les propriétés immunostimulantes de ce produit (98); il provoque une stimulation non spécifique de la synthèse des immunoglobines chez la souris. L'injection intra-musculaire de 1 mg de cette substance provoque une élévation marquée et prolongée des taux sériques en Ig M et Ig G, ainsi qu'une augmentation du nombre de PFC (NAKASHIMA et KATO (99)).

7°) Nocardia opaca.

Un extrait hydrosoluble de *Nocardia opaca* (extrait N.W.S.E. de BONA et coll. (17)) provoque une stimulation puissante des lymphocytes spléniques de la souris et du lapin et une augmentation moins importante, mais significative, de l'incorporation de la thymidine marquée par les lymphocytes périphériques humains.

8°) Les lipopolysaccharides des bacilles Gram négatifs.

Les premières constatations faisant état du rôle probable des LPS, par ROWLEY (115), portent sur le fait que l'injection de certaines bactéries Gram - accroît la résistance non spécifique aux infections, contrairement aux bactéries Gram +. Bientôt, le même auteur (116) démontre que l'augmentation de la résistance est liée, non pas à la bactérie entière, mais au lipopolysaccharide de la paroi, c'est à dire à l'endotoxine bactérienne. Depuis, le pouvoir immunogène du lipopolysaccharide de paroi des Gram - a été très étudié, surtout chez les Enterobacteriaceae. En particulier HOWARD et coll. (68) ont démontré que c'est le lipide A du LPS qui est responsable de cette immunité non spécifique.

Le pouvoir immunostimulant du LPS a été confirmé par de nombreux travaux. Une injection de LPS, 24 heures avant

l'épreuve, protège contre *Klebsiella pneumoniae* (PARANT et coll. (101)). Le LPS de *Salmonella* induit une résistance non spécifique contre *Klebsiella pneumoniae* et, dans certains cas, contre *Listeria monocytogenes* (PARANT et coll. (103)). Une injection sous-cutanée d'endotoxine bactérienne augmente le pouvoir bactéricide des macrophages spléniques et hépatiques envers *L. monocytogenes* (FAUVE et HEVIN (37)).

Le mode d'action du LPS est maintenant bien connu. Son activité est biphasique. Dans les heures qui suivent l'injection, apparaît une dépression du système immunitaire, puis, 24 heures plus tard, on note une stimulation (FAUVE et HEVIN (37)). En ce qui concerne les cellules mises en cause dans l'immunostimulation par le LPS, on note cependant des divergences. Pour DRESSER et PHILLIPS (30), ce sont les lymphocytes B qui sont principalement mis en jeu. Pour MACGHEE et coll. (88), ce sont les lymphocytes T et les macrophages qui sont responsables de l'activité, contrôlant, dans un second temps, la réponse des lymphocytes B.

9°) Les enterobactéries.

A côté de l'action du LPS, il faut signaler que *Salmonella typhi* tuée a une action immunostimulante sur les réactions à médiation cellulaire. Ainsi cette bactérie a une action inhibitrice sur la tumeur d'Ehrlich et le sarcome T de Betz (HALPERN et coll. (69)).

10°) La toxine cholérique.

La toxine cholérique, expérimentée sur la souris par KATELEY et coll. (78) a une action positive sur la réponse immunitaire.

11°) Les préparations ribosomales.

Le pouvoir immunostimulant spécifique des préparations ribosomales est maintenant bien établi. Mais certaines de ces préparations présentent en plus des propriétés d'immunostimulant non spécifique.

Ainsi YOUNG et YOUNG (134) ont démontré que l'injection de ribosomes de mycobactéries accroît la réponse

humorale de la souris à la sérumalbumine bovine et GUMBINER et coll. (60) ont pu provoquer avec le même produit une encéphalite allergique auto-immune.

D'autre part ROBERT (113) a démontré l'efficacité d'une préparation de ribosomes isolés de bactéries d'origine respiratoire associés à un peptidoglycane de *Klebsiella pneumoniae*, vis-à-vis d'infections respiratoires. Le même produit entraîne une stimulation des macrophages alvéolaires de cobaye (ROBERT et coll. (à paraître)), une augmentation du nombre de PFC et une accélération de la vitesse d'élimination du carbone colloïdal.

D E U X I E M E P A R T I E

CHAPITRE PREMIER.

MATERIELS ET METHODES.

I - LES ANIMAUX.

Ils sont représentés par:

- 1 123 souris de souche Balb/C provenant d'un élevage en colonie close, âgées de 5 à 7 semaines au moment des expériences.
- 7 cobayes de poids moyen 250 g, utilisés plus particulièrement pour le test de phagocytose.

II - LE PRODUIT A ETUDIER.

Le produit à pouvoir immunostimulant supposé est un extrait phénosoluble (E P S) de la paroi de Neisseria meningitidis*. Il est composé quasi exclusivement de protéines. Les contrôles physico-chimiques ont donné les résultats suivants, exprimés en pourcentage du poids sec (E P S lot A 87*):

- azote total 15,6 %
- azote protéique en % de l'azote total 98 %
- protéines dosées par la méthode de Lowry
(étalon sérumalbumine bovine) 110 %
- acide ribonucléique 0,4 %
- acide désoxyribonucléique < 0,5 %
- hexoses < 0,5 %
- K⁺ 1 %
- phénol 0,08 %

Spectre ultra-violet:

Longueur d'onde d'absorption maximale $\lambda_{MAX} = 278 \text{ nm}$
 DO 280 / DO 260 1,30
 absorption spécifique de la solution à 1 % (P-V)
à $\lambda_{MAX} = 9,42$

*Nous remercions l'Institut Mérieux d'avoir bien voulu nous confier ce produit pour nos expériences.

III - ETUDE DU POUVOIR PROTECTEUR DE L'E P S.

A / Les différentes voies de stimulation:

1°) Voie sous-cutanée.

Chaque souris reçoit 200 μ g d'E P S en solution dans 0,2 ml d'eau distillée (solution à 1 mg/ml).

2°) Voie orale.

Chaque souris reçoit 125 μ g d'E P S en solution dans 0,2 ml d'eau distillée (solution à 0,625 mg/ml). L'inoculation est pratiquée grâce à une aiguille à biseau coupé faisant office de sonde oesophagienne (IO).

3°) Voie intra-nasale.

Les animaux ont également été stimulés par voie intra-nasale, après légère anesthésie à l'éther. Une pipette automatique à embout plastique délivre 25 μ l d'une solution d'E P S à 5 mg/ml (soit 125 μ g par souris).

4°) Voie aérosol.

a) dispositifs expérimentaux.

Il s'agit du matériel déjà décrit et mis au point à la Division de Microbiologie du C.R.S.S.A. par FONTANGES et FOURNIER (40) (figure 3).

Il comprend:

- le caisson à aérosols: c'est un parallélépipède rectangle en acier inoxydable d'un volume de 180 l. Un orifice sur la paroi frontale permet l'entrée de l'aérosol. Un autre orifice, situé sur le plancher, est relié à un extracteur. Enfin d'autres orifices situés sur les parois latérales reçoivent une sonde à prélèvements et les fibres optiques qui sont reliées au module de détection. La partie supérieure du caisson est constituée par une plaque mobile, transparente, en plexiglas .

- le générateur d'aérosol: pour l'E P S en solution (solution à 25 mg/ml), nous avons utilisé un générateur en verre de type Collison. IL est constitué par une ampoule munie de deux orifices: un orifice supérieur

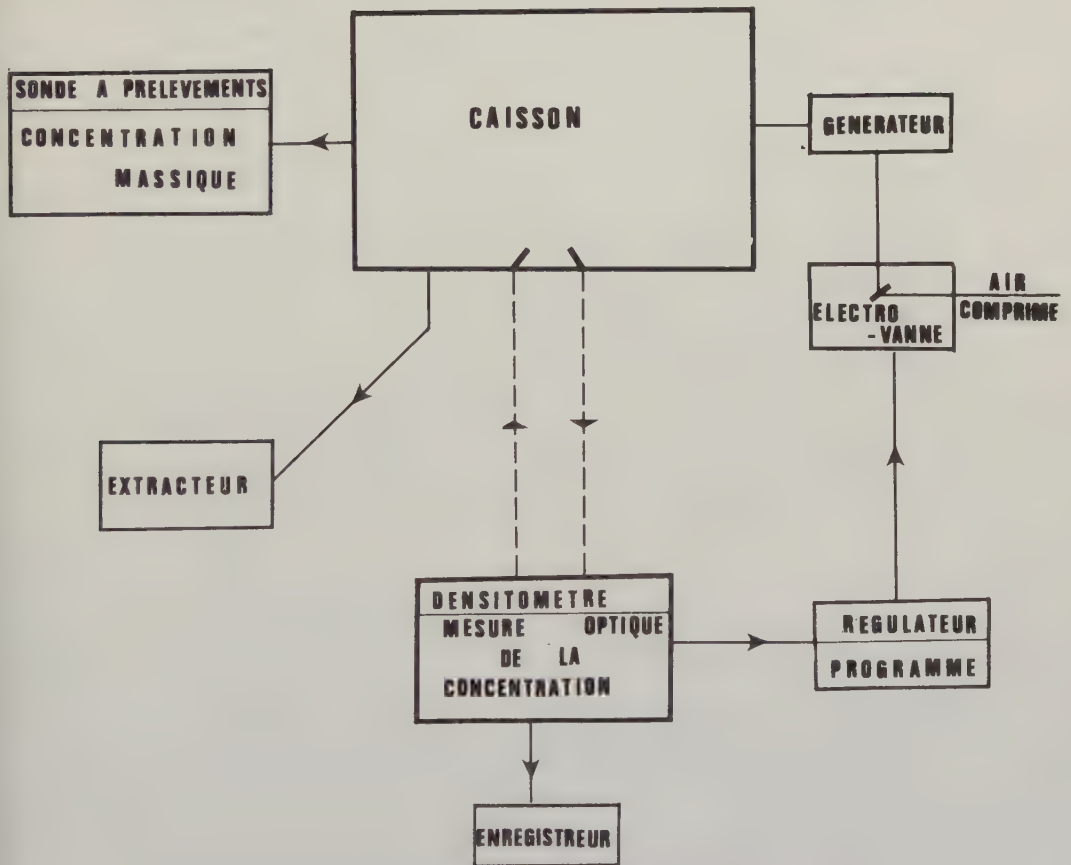


FIGURE 3 : Principaux éléments de l'appareillage de régulation des aérosols.

de dispersion et un orifice inférieur par lequel arrive l'air comprimé. Des chicanes, situées avant l'orifice de dispersion, permettent de retenir les plus grosses particules.

Dans le cas où l'E P S était sous forme de poudre, nous avons utilisé un dispositif original: une seringue en plastique constitue le réservoir de poudre. Le piston de cette seringue est poussé mécaniquement par une vis sans fin, ce qui permet de présenter la poudre de manière continue devant l'orifice d'un Venturi. Il se produit une aspiration dans la chambre cylindrique de broyage. Celle-ci fonctionne d'après le principe du broyeur à tuyère de KORDA (82): la poudre est soumise à un mouvement circulaire très rapide sous l'action de filets d'air dont la vitesse est très grande, qui provoquent la dissociation des grosses particules. La force centrifuge étant fonction de la masse, les plus fines se rapprochent du centre de la chambre de broyage. Lorsqu'elles sont suffisamment légères, elles sont entraînées vers l'extérieur par un orifice situé selon l'axe de symétrie du dispositif. Cet orifice est muni d'un cyclone qui concentre l'aérosol.

- le densitomètre, qui constitue le dispositif de contrôle de la concentration de l'aérosol.

Il est formé par:

- un système de détection optique,
- un amplificateur,
- un changeur de gamme de sensibilité de mesure,
- un enregistreur.

La régulation porte sur la concentration en particules de l'aérosol, indépendamment de la taille de celles-ci entre deux valeurs présélectionnées: un minimum et un maximum.

Cet appareillage permet ainsi de maintenir facilement une concentration particulière donnée d'aérosol pendant tout le temps désiré (figure 4: exemple d'enregistrement).

Une sonde reliée à une pompe aspirante permet de connaître la concentration massique de l'aérosol, grâce à la pesée de prélèvements réalisés sur filtres millipores de porosité 0,2 μ .

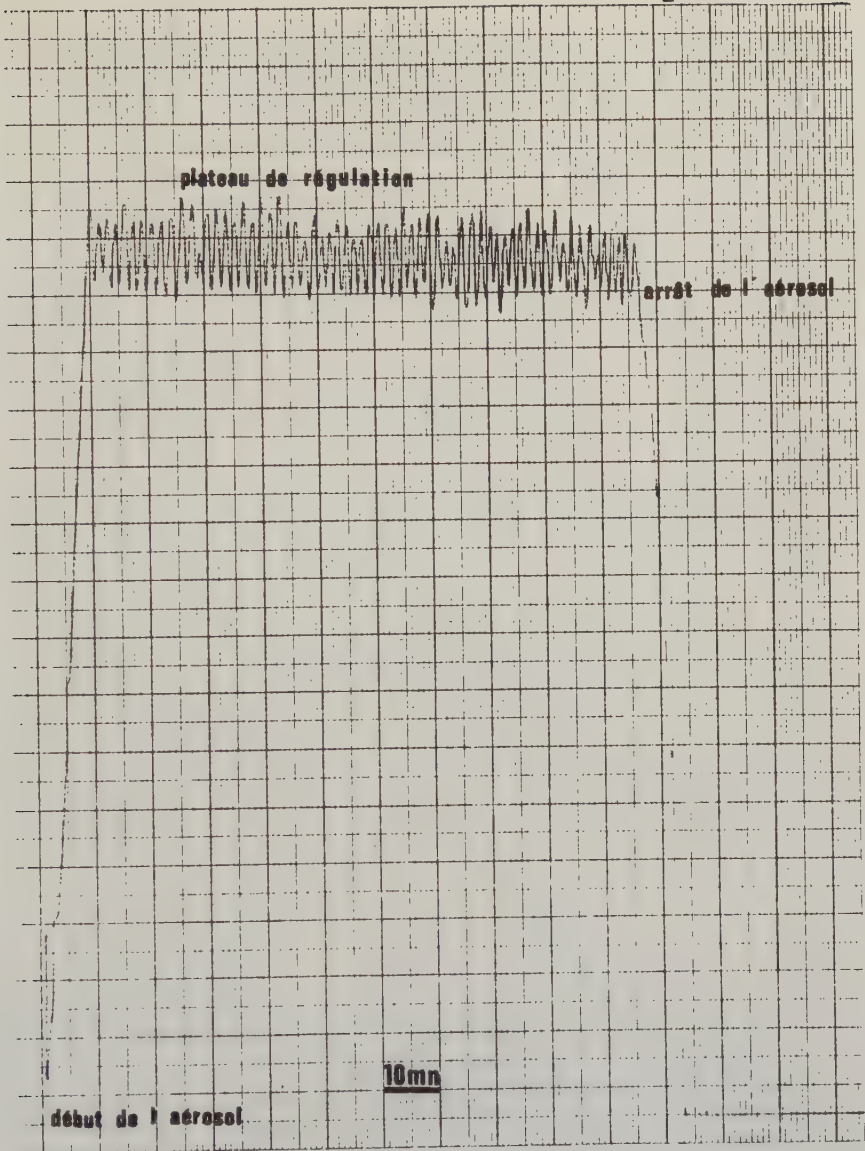


FIGURE 4 : Enregistrement de la régulation
d'un aérosol liquide d' E.P.S.

b) détermination de la dose théorique inhalée.

Elle est donnée par la formule:

$$D T I = C.V.T.$$

où: .C., exprimée en mg/l est la concentration massique de l'aérosol, obtenue à partir de prélèvements,

.V., exprimé en l/mn est le débit ventilatoire de l'espèce animale utilisée, calculée d'après la formule de GUYTON (2): $V = 2,1 P^{3/4}$ avec V en ml/mn et P, poids de l'animal, en grammes.

Chez la souris, Vest égal, en valeur moyenne, à 25 ml/mn.

.T., exprimé en mn, est la durée moyenne de l'aérosol.

Au cours de nos expériences, la D T I a été fixée à 200 μ g à chaque aérosol, quelle que soit la présentation de l'E P S, en solution ou en poudre.

c) mesure de la taille des particules.

Elle a été réalisée à l'aide d'un compteur corpusculaire électronique (Royco 225, module 518).

Cet appareil détermine par photométrie le nombre de particules réparties dans une gamme de tailles données.

Les gammes utilisées ont été les suivantes:

- 0,5 - 0,7 μ
- 0,7 - 1,4 μ
- 1,4 - 3 μ
- 3 - 5 μ
- 5 - 10 μ

Toutes les minutes, nous obtenons, sur une imprimante, le nombre de particules présentes dans l'atmosphère du caisson pour chacune de ces gammes.

B / Les différents types d'épreuves.

Quatre types d'épreuves ont été utilisés pour étudier le pouvoir protecteur non spécifique conféré par l'E P S.

- Klebsiella pneumoniae type I, par aérosol,
- Myxovirus influenzae (APR8, Ho N₁), par aérosol,
- Streptococcus pyogenes (groupe H) par voie intranasale,
- Klebsiella pneumoniae type I par voie intra-péritonéale.

1°) Epreuve par aérosol.

Les aérosols d'épreuve sont obtenus à l'aide du générateur Collison. Aucun contrôle de concentration n'est effectué sur les aérosols d'épreuve car la standardisation des conditions d'expérimentation permet une bonne reproductibilité de l'infection.

Le dispositif expérimental varie selon le germe à utiliser:

a) Myxovirus influenzae (APR8, H₀ N₁)

Les souris à éprouver sont placées -témoins et stimulées mélangées après avoir été repérées- dans des cylindres horizontaux étanches, en acier inoxydable.

Les concentrations utilisées se situent entre le 1/50 et le 1/400 -en fonction du lot d'expérience - à partir d'un liquide allantoïque d'oeufs embryonnés infectés par le Myxovirus. Ce lot initial correspond à un titre de 100 DL₁₀₀ .

La durée d'exposition est de 15 mn. La pression de l'air comprimé de l'alimentation du générateur est 1,4 bars.

b) Klebsiella pneumoniae Type I.

L'aérosol est dispersé dans un petit caisson maintenu en dépression par une pompe à palettes protégée par une cartouche de Silicagel (Prolabo) et par un filtre absolu. Ce caisson est placé dans une boîte à gants en plexiglas, étanche, reliée par un sas à une seconde boîte à gants où les animaux sont laissés en observation. On maintient une dépression dans cette enceinte grâce à un extracteur à double paroi filtrante. Cette double barrière de protection -dépression dans le caisson et dans la boîte à gants- assure la sécurité des expérimentateurs.

Nous avons utilisé deux concentrations de bactéries: 4.10⁸ germes/ml et 8.10⁷ germes/ml.

Chaque aérosol dure 8mn et la pression d'alimentation de l'air comprimé est de 1,4 bars.

2°) Epreuve par voie intra-nasale.

Le germe d'épreuve est un Streptococcus pyogenes -groupe H de Lancefield- provenant de l'Institut Mérieux (souche IM 806). La suspension d'épreuve est administrée à raison de 25 μ l par souris après légère anesthésie à l'éther.

Nous avons utilisé trois doses d'épreuve:

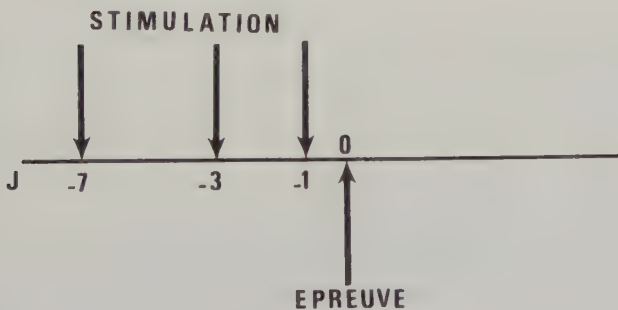
- $3,3.10^6$ germes par souris,
- $3,3.10^5$ germes par souris,
- $3,3.10^4$ germes par souris.

3°) Epreuve par voie intra-péritonéale.

0,5 ml d'une suspension d'épreuve de Klebsiella pneumoniae est injecté à chaque souris, qui reçoit ainsi 100 germes environ.

C / Organigramme de l'expérimentation.

Chaque animal a été soumis à trois inoculations par voie nasale, aérosol ou orale à J-7, J-3, J-1, J 0, correspondant au jour de l'épreuve. Pour le cas de la stimulation par voie sous-cutanée, les animaux ont été soumis à une injection par semaine pendant douze semaines.



IV - ETUDE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE.

A / Technique des plaques d'hémolyse directe:

"Plaque Forming-Cells"

1°) Stimulation.

L'E P S est inoculé par voie orale, en solution aqueuse à raison de 1 mg par souris, par jour, pendant cinq jours consécutifs.

L'antigène, représenté par des globules rouges de mouton (G R M), est injecté par voie intra-veineuse, au niveau des veines caudales, à la dose de 10^8 G R M dans 0,1 ml de sérum physiologique par animal.

2°) Suspension de cellules spléniques.

Trois, quatre ou cinq jours après l'injection de l'antigène, selon les lots, on effectue une suspension des cellules spléniques de chaque animal (24). Les différents temps de cette préparation sont les suivants:

- 1 - anesthésie de l'animal à l'éther et sacrifice par exsanguination carotidienne,
- 2 - prélèvement de la rate et broyage dans un broyeur de tissus, avec 2 ml de milieu de Eagle,
- 3 - centrifugation de la suspension (180g-5mn) après passage sur gaze,
- 4 - remise en suspension du culot dans 2 ml d'une solution hémolysante, après élimination du surnageant; la suspension obtenue est centrifugée comme précédemment,
- 5 - élimination du surnageant; le culot, repris dans 2 ml de milieu de Eagle est de nouveau centrifugé,
- 6 - élimination du surnageant; le culot est repris dans 2 ml de milieu de Eagle,
- 7 - la suspension est alors passée sous pression au travers d'une aiguille de diamètre 0,45 mm puis filtrée sur gaze,
- 8 - numération des cellules mononucléées.

La suspension cellulaire ainsi obtenue est rapidement utilisée par les plages de lyse.

3°) Plages d'hémolyse directe.

La technique utilisée est la microtechnique sur lame en milieu liquide de CUNNIGHAM et SZENBERG (26).

a) préparation des lames:

Sur une lame porte-objet ordinaire soigneusement dégraissée et dépoussiérée, on colle trois bandes parallèles d'adhésif double face, séparées de 1,5 cm environ. Des lamelles couvre-objets de 22 X 22 mm, dégraissées, sont appliquées sur l'adhésif, de manière à former deux "chambres" entre lame et lamelles.

b) préparation de la suspension cellulaire:

Une fraction de la suspension splénique est ajustée à 25 000 cellules mononucléées par mm^3 . Dans un petit tube, on mélange, à l'aide d'une pipette automatique:

- 0,025 ml de sérum normal de cobaye, servant de complément,

- 0,025 ml de la suspension de GRM à 50 % du culot,

- 0,15 ml de milieu de Eagle,

- 0,05 ml de la suspension cellulaire splénique à 25 000 cellules/ mm^3 .

Après homogénéisation, la suspension est introduite par capillarité dans les "chambres de Cunningham". Les bords libres sont ensuite scellés à la paraffine. La lame est alors placée à l'étuve à 37°C, en chambre humide.

c) lecture:

Après une heure d'incubation à l'étuve, la lame est examinée au microscope, au grossissement 10. Les plages de lyse se reconnaissent facilement. On examine cinq bandes optiques verticales sur chaque demi-lame et on compte le nombre de plages de lyse. Un calcul théorique permet d'établir le nombre de cellules formant des plages de lyse directe pour 10^6 cellules. En effet, si $\underline{x}$ représente le nombre de plages observées, $\underline{x}$ le nombre de cellules examinées, le nombre de plages

de lyse pour 10^6 cellules est donné par la formule:

$$N = \frac{X}{X} \cdot 10^6 \quad ; \text{ or } X = CV = Cn e l L$$

$$\text{d'où: } N = \frac{x \cdot 10^6}{C n e l L}$$

où: C = concentration finale des cellules spléniques,

V = volume observé,

n = nombre de bandes optiques,

e = épaisseur de l'adhésif,

l = largeur du champ optique,

L = longueur d'une bande optique.

4°) Protocole.

Il est résumé par l'organigramme suivant:



B / Test d'épuration du carbone colloïdal:

C'est une méthode fondée sur l'élimination du carbone colloïdal par les cellules de Küpffer du foie et les macrophages de la rate.

1°) Technique:

La technique utilisée est celle de BIOZZI et coll. (13,14) modifiée.

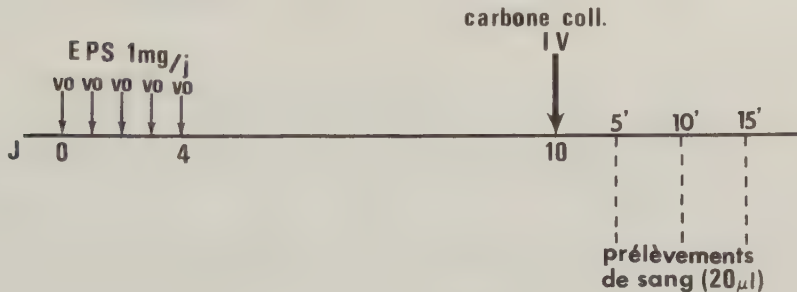
On réalise une suspension colloïdale de particules de carbone en diluant de l'encre de Chine au 1/8 dans une solution de gélatine à 1 %. Chaque souris, d'un poids de 20 g environ, reçoit 0,2 ml de cette suspension par voie intra-veineuse. On prélève ensuite 20 μ l de sang par ponction au niveau du sinus rétro-orbitaire, 5, 10 et 15 minutes après l'injection du carbone colloïdal. Ce volume de sang est immédiatement déposé dans 2 ml d'une solution hémolysante de $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ à 1 %. L'ensemble est agité fortement. Un échantillon de référence pour

la photométrie est prélevé sur une souris témoin qui n'a pas reçu de carbone colloïdal.

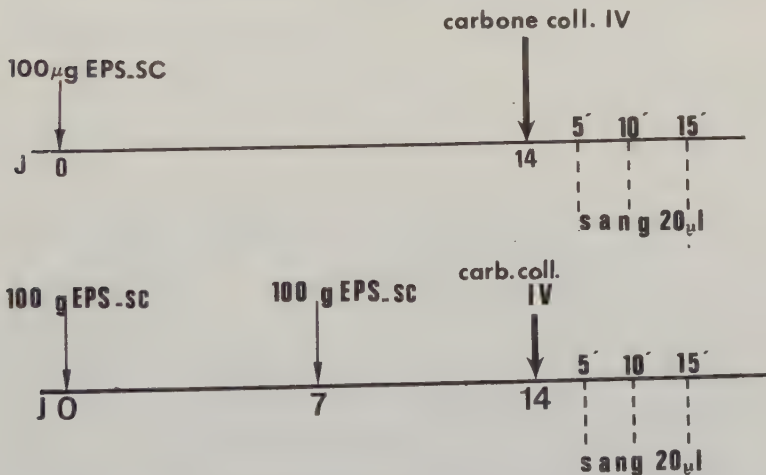
2°) Protocole:

Trois protocoles de stimulation ont été employés:

-le premier utilisait la voie orale:



-le deuxième et le troisième la voie sous-cutanée:



3°) Interprétation des résultats:

Le coefficient de phagocytose brut (C P B) est donné par la formule:

$$\text{C P B} = \sqrt[3]{\frac{\text{K}}{9}}$$

où K représente la pente de la droite d'épuration donnée par les D. O. à 5 mn et 15 mn (la D. O. à 10 mn sert de

vérification). Le chiffre 9 représente le module du papier semi-logarithmique utilisé (distance entre 1 et 10).

Ce coefficient de phagocytose brut est ensuite corrigé en fonction du poids de la souris (P_s), du poids de la rate (P_r) et du poids du foie (P_f):

$$\text{indice phagocytaire corrigé: } \varphi = \frac{P_s}{P_r + P_f} \sqrt[3]{\frac{K}{9}}$$

Calcul statistique:

Nous avons appliqué aux résultats obtenus le test du t de Student de comparaison de deux moyennes.

A la fin de l'expérience, nous avons six valeurs à considérer:

- l'effectif final de chaque échantillon (après suppression des valeurs aberrantes):

$$n_E, n_T \quad (E = \text{essai}) \\ (T = \text{témoin})$$

- la moyenne de chaque lot:

$$\bar{x}_E, \bar{x}_T$$

- l'écart type de chaque lot:

$$\sigma_E, \sigma_T$$

La valeur du t de Student est donnée par la formule:

$$t = \frac{|\bar{x}_E - \bar{x}_T|}{\sqrt{\sigma^2 \left(\frac{1}{n_E} + \frac{1}{n_T} \right)}} \quad \sigma^2 = \frac{n_E \sigma_E^2 + n_T \sigma_T^2}{n_E + n_T - 2}$$

On lit dans la table de T le seuil T_{95} ou T_{99} correspondant pour une sécurité de 95 % ou 99 % à:

$$V = n_E + n_T - 2 \text{ degrés de liberté:}$$

.. si $t > T_{95}$, la différence entre les deux lots est significative à 95 %;

.. si $t > T_{99}$, la différence entre les deux lots est significative à 99 %.

C / Test d'inhibition de la migration des macrophages.

Nous avons utilisé la technique de migration des macrophages en tubes capillaires décrite par GEORGE et VAUGHAN (50) ,développée par DAVID et coll. (27) et BLOOM et BENNET (16).

1°) Préparation des cellules spléniques.

Après anesthésie à l'éther, les souris sont sacrifiées par exsanguination carotidienne. La rate est prélevée et placée dans un broyeur contenant 10 ml de milieu de Hanks hépariné à 10 μ g/ml. Après broyage et sédimentation, l'ensemble est filtré sur gaze de nylon dans des tubes siliconés, puis centrifugé 10 mn à 1 400 tours/mn. Les cellules sont lavées dans 10 ml de milieu de Hanks; le culot est repris par 1 ml de milieu A comprenant 85% de milieu 199 (Bio-Mérieux), 15% de sérum de veau, 100 μ g de streptomycine par ml, 100 unités de pénicilline par ml.

On compte les cellules. Puis on les reprend dans du milieu A, de façon à obtenir une concentration finale voisine de 8.10^7 /ml. Les cellules sont alors préincubées dans du milieu A + 20 μ g/ml d'E P S.

2°) Préparation des tubes capillaires et des plaques de migration.

La suspension cellulaire est introduite par capillarité dans des tubes à hématocrite, lesquels, après obturation par du cristaseal (laboratoire HAWKSLEY) sont soumis à une centrifugation de 1 200 tours/mn pendant 5 mn à 4°C. Pour une même rate, on utilise six tubes. Après centrifugation, on les sectionne environ 2 mm au-dessus du culot cellulaire, puis on les dépose, deux par deux, tête-bêche, au fond des alvéoles d'une plaque de polystyrène après qu'ils aient été imprégnés, à l'extrémité bouchée, de graisse siliconée.

Chaque alvéole est alors rempli de milieu A + 20 μ g/ml d'E P S, recouvert d'une lamelle, puis mis en incubation 24 heures à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂.

3°) Lecture des surfaces de migration.

Les surfaces de migration sont observées sur un écran adapté sur le statif d'un microscope. Les contours de ces surfaces sont relevés sur des feuilles de papier calque et, après découpage soigneux, pesés sur une balance de précision et mesurés par planimétrie.

4°) Expression des résultats.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la migration (IMM):

$$\% \text{ IMM} = 100 - \text{IM} \times 100$$

$$\text{IM} = \text{index de migration} = \frac{\text{ME}}{\text{MT}}$$

MT = somme des poids en mg des surfaces de migration ou somme des mesures de ces surfaces, pour le groupe témoin,

ME = somme des poids en mg des surfaces de migration ou somme des mesures des surfaces, pour le groupe "essais".

Nous avons appliqué à ces résultats le t de Student de comparaison de deux moyennes (B - 3°).

5°) Dosage des protéines.

En plus de la mesure de l'inhibition de la migration, nous avons dosé les protéines extra-cellulaires et intra-cellulaires:

a) dosage des protéines extra-cellulaires.

Nous avons utilisé la méthode de LOWRY (87), adaptée à une chaîne analytique Technicon (après dilution au 1/200 pour que les valeurs soient situées dans la gamme d'étalonnage de l'appareil), à partir de prélèvements de 0,1 ml du contenu des cupules.

b) dosage des protéines intra-cellulaires.

Après avoir retiré le milieu nutritif résiduel, nous avons disposé 0,2 ml d'eau distillée dans chaque cupule. Nous avons ensuite soumis ce matériel à trois cycles successifs de congélation-décongélation,

avant de prélever 0,05 mg du lysat cellulaire ainsi obtenu. Le dosage des protéines a été réalisé par la même méthode que précédemment, mais après dilution des prélèvements au 1/50 .

6°) Protocole de stimulation.

Les animaux ont été répartis en lots de 6. Certains de ces lots ont été stimulés par l'E P S. D'autres n'ont subi aucun traitement et ont servi de témoins.

Les animaux stimulés ont reçu quotidiennement, par voie orale pendant cinq jours consécutifs, 1 mg d'E P S sous un volume de 0,2 ml. Le prélèvement des cellules spléniques a été effectué 10 jours après la première stimulation.

D / Mesure de l'activité des macrophages alvéolaires de cobayes.

La technique utilisée a été mise au point au C.R.S.S.A. par ROBERT (113).

1°) Récolte des macrophages alvéolaires.

L'animal utilisé dans cette expérience est le cobaye, car la souris fournit des quantités trop faibles de macrophages alvéolaires. Les animaux pèsent environ 300 g au moment du prélèvement.

Les macrophages sont récoltés à l'aide de lavages trachéo-bronchiques, en utilisant le milieu suivant:

- milieu M 199 à pH 7,
- sérum de veau décomplémenté (concentration finale: 20%)
- pénicilline 500 UI/ml.
- dihydrostreptomycine 50 µg/ml.

L'animal est sacrifié à l'éther. On réalise ensuite une intubation trachéale, suivie de cinq lavages successifs de 5 ml environ chacun. Les prélèvements sont conservés à +4°C dans des flacons siliconés.

2°) Numération cellulaire et mise en culture des macrophages.

On dépose un échantillon du prélèvement à étudier dans une cellule de Nageotte. Après une incubation d'une heure et demie à deux heures, en chambre humide à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO₂, on vide la cellule et on la rince au sérum physiologique. On compte les cellules adhérentes, ce qui permet de répartir les prélèvements dans des boîtes Falcon, de manière à obtenir pour chaque échantillon le même nombre de ces cellules (250 000 à 300 000).

Après une nuit d'incubation à 37°C sous CO₂, on effectue trois lavages successifs avec du milieu 199 pour éliminer les hématies, les lymphocytes, les polynucléaires et les antibiotiques.

On compte les cellules adhérentes au microscope inversé Wild en explorant cinq champs optiques.

3°) Test de phagocytose de Klebsiella pneumoniae.

La souche de Klebsiella pneumoniae utilisée est conservée sur souris infectée puis congelée à - 30°C. La souche est repiquée et mise en incubation une nuit à 37°C.

a) opsonisation.

Il est nécessaire d'opsoniser les germes qui vont être utilisés pour le test de phagocytose par du sérum normal de cobaye. Dans ce but, on utilise une préparation faite de:

- 1,4 ml de milieu 199,
- 0,4 ml de sérum normal de cobaye,
- 0,2 ml de suspension bactérienne à 4.10⁸ germes/ml

Ces différents éléments sont mis en contact entre eux pendant 30 mn à 40°C.

b) phagocytose.

Environ 250 000 macrophages fixés sur boîte Falcon sont mis en contact avec un million de Klebsiella pneumoniae, contenus dans un volume de 2,5 ml. Le milieu

d'incubation est formé de M I99, de sérum de veau foetal employé à la concentration de 20% et de sérum normal de cobaye employé à la concentration de 10%. La phagocytose a lieu à 37°C sous CO₂.

Chaque heure et demie, 0,1 ml de surnageant est prélevé stérilement et dilué dans une gamme de raison 10, avec du sérum physiologique. Cette gamme est ensuiteensemencée sur boîtes de Pétri. La numération correspondante permet de connaître l'évolution de la concentration bactérienne du milieu en fonction du temps.

4°) Mesure de l'activité enzymatique des macrophages.

Deux enzymes ont été étudiées:

- la phosphatase acide et
- la N acétyl- β -D-glucosaminidase.

a) préparation des lysats cellulaires.

Après un délai d'une nuit permettant aux cellules (au nombre d'un million environ) d'adhérer sur leur support en plastique, on lave les boîtes de culture trois fois de suite avec 5 ml de sérum physiologique. Les cellules sont ensuite congelées dans un volume de 2 ml d'eau distillée puis soumises à cinq cycles de congélation-décongélation afin d'obtenir des lysats cellulaires.

b) dosage de la phosphatase acide.

Nous avons réalisé le dosage de cette enzyme avec un kit Bio-Mérieux qui utilise la méthode de Kind et King (79) modifiée. Son principe est le suivant: l'enzyme, en agissant sur un substrat (phényl phosphate disodique) à pH 4,9, libère du phénol qui est dosé en présence d' amino-4 antipyrine et de ferricyanure de potassium. La présence d'arséniate de sodium dans le réactif à l' amino antipyrine permet de bloquer la réaction enzymatique après l'incubation à 37°C. La coloration rouge obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique.

Les résultats sont exprimés en moles de substrat hydrolysé par minute et par million de macrophages.

Pratiquement, on réalise la galerie de tubes suivante:

	Blanc	Echantillon	Etalon
Phényl phosphate disodique 0,01 M	0,5	0,5	0,5
Tampon citrate pH 4,9	0,5	0,3 ou 0,4	0,49 ou 0,45
Lysat cellulaire	-	0,2 ou 0,1	-
Etalon phénol 200 g/ml	-	-	0,01 ou 0,05
=====			
Une heure à 37°C			
=====			
Solution d'arséniate de Na et d'amino-4 antipyrine	1	1	1
Ferricyanure de potassium	1	1	1

Lecture au photomètre à 510 nm.

c) dosage de la N acétyl β D glucosaminidase.

L'enzyme en agissant sur le substrat (p nitrophényl N acétyl β D glucosamine) libère du p-nitrophénol. La réaction se fait à pH 4,2. Après une demi-heure d'incubation à la température de 37°C, la réaction est arrêtée par addition de borate de sodium 0,2 M pH 9,8. Le p nitrophénol libéré donne, à pH alcalin, une couleur jaune pouvant être lue à 400 nm. Une courbe étalon de p nitrophénol est réalisée avec les concentrations suivantes: 2,5 , 12,5 et 25 μ g/ml.

Le tableau suivant indique la galerie réalisée:

	Blanc	Echantillon	Etalon
Substrat 3 mM	0,3	0,3	0,3
Tampon citrate pH4,2	0,2	0,15 ou 0,10	0,1
Lysat cellulaire	-	0,05 ou 0,10	-
Etalon p nitrophénol	-	-	0,1
=====			
Une demi-heure à 37°C			
=====			
Borate de sodium 0,2M	0,5	0,5	0,5

Composition du tampon citrate:

citrate de sodium 0,05 M

Na Cl 0,10 M

sérum albumine bovine ... 0,01 %

CHAPITRE SECOND.

RESULTATS.

I - POUVOIR PROTECTEUR DE L'E P S.

A / Après stimulation par voie sous-cutanée.

Les résultats que nous avons obtenus sont indiqués dans le tableau III.

Nous pouvons remarquer que l'E P S, injecté à la dose de 200 g par voie sous-cutanée, de manière répétée (une injection/semaine pendant 12 semaines) ne protège pas contre une infection par *Klebsiella pneumoniae* ou par *Streptococcus pneumoniae*, ces germes étant injectés par voie intra-péritonéale.

B / Après inoculation sous forme d'aérosol liquide.

Nous avons indiqué les résultats obtenus dans le tableau IV.

Nous pouvons remarquer qu'un aérosol liquide d'E P S protège, de manière significative, contre une infection, par la même voie, de *Klebsiella pneumoniae* ou de *Myxovirus influenzae*. Par contre, ce même aérosol ne protège pas contre une infection par *Streptococcus pyogenes* inoculé par voie intra-nasale, ni contre une infection par *Klebsiella pneumoniae* injectée par voie péritonéale.

C / Après inoculation sous forme d'aérosol sec.

Un aérosol d'E P S sous forme de poudre protège contre le virus grippal (tableau V). En revanche on n'enregistre pas de protection significative vis à vis des autres germes utilisés. On peut cependant noter un retard de mortalité, bien que non significatif, lors de l'épreuve par *Klebsiella pneumoniae* injecté par voie I. P..

Types d'épreuves	Lots d'animaux	J ₀	J ₁	J ₂	J ₃	J ₄	J ₅
Kp I.P. 1 000 germes	T ₁	20	20	0	0	0	0
	S ₁	20	20	6	2	1	0
Streptococcus pneumoniae 400 germes	T ₂	20	20	1	0	0	0
	S ₂	20	20	2	1	0	0

T₁ , T₂ = animaux témoins,

S₁ , S₂ = animaux stimulés par l'E P S.

TABLEAU III: Pouvoir protecteur de l'E P S
après stimulations répétées par voie sous-cutanée.

TYPE D'ÉPREUVES	LOTS D'ANIMAUX	Animaux survivants, f (t)																
		J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J20
VG.AL (1/100)	R 11	20	20	20	20	20	20	20	19	18	18	18	16	16	16	16	16	16
	T 11	20	20	20	20	20	20	19	18	11	3	1	1	0	0	0	0	0
VG.AL (1/400)	R 12	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	T 12	20	20	20	20	20	20	20	20	18	16	16	14	14	14	13	13	13
St.p.in (10 ⁶)	R 13	20	20	20	10	7	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	T 13	20	20	20	12	7	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
St.p.in (10 ⁵)	R 14	20	19	17	14	13	10	10	10	9	8	8	8	7	7	7	7	7
	T 14	20	20	18	16	11	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Kp.AL (4.10 ⁸)	R 15	20	19	19	18	17	17	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	T 15	20	17	17	10	5	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3
Kp.AL (8.10 ⁷)	R 16	20	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	T 16	20	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Kp.ip (2000)	R 17	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T 17	20	19	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

TABLEAU IV : Etude comparative du nombre d'animaux survivants, après stimulation par aérosol liquide (R) ou non (T), en fonction du temps et du type d'épreuve.
(*: significatif $\alpha = 5\%$ **: significatif $\alpha = 1\%$).

TYPE D'ÉPREUVES	LOTS D'ANIMAUX	Animaux survivants, f (t)																
		Jo	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J20
VG.AL (1/50)	R 21	20	20	20	20	20	16	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T 21	20	20	20	20	20	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VG.AL (1/200)	R 22	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	18	18	17	17	17	17
	T 22	20	20	20	20	20	20	20	13	10	9	7	7	6	6	6	6	6
St.p.in (10 ⁶)	R 23	20	20	15	13	9	9	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	T 23	20	20	17	8	5	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
St.p.in (10 ⁵)	R 24	20	20	20	17	14	13	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11
	T 24	20	20	19	18	17	16	16	15	13	12	11	10	9	8	7	7	6
Kp.AL (4x10 ⁸)	R 25	20	20	20	18	17	16	15	12	11	11	10	10	10	10	10	10	10
	T 25	20	20	20	16	14	12	12	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10
Kp.AL (8.10 ⁷)	R 26	20	20	20	19	17	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	T 26	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Kp.ip (100)	R 27	20	20	20	17	15	15	15	13	13	13	13	13	12	10	10	10	10
	T 27	20	20	19	10	7	7	7	7	7	7	7	6	5	5	5	5	5

TABLEAU V : - Etude comparative du nombre d'animaux survivants, après stimulation par aérosol poudre (R) ou non (T), en fonction du temps et du type d'épreuve.
(#: significatif $\alpha = 5\%$, **: significatif $\alpha = 1\%$).



TYPE D'ÉPREUVES	LOTS D'ANIMAUX	Animaux survivants, f (t)																
		Jo	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J20
VG.AL (1/10)	R 31	20	20	20	20	20	17	12	7	3	1	1	1	1	0	0	0	0
	T 31	20	20	20	20	18	12	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VG.AL (1/100)	R 32	20	20	20	20	20	20	20	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	T 32	20	20	20	20	20	19	18	10	5	4	4	3	3	3	3	3	3
St.p.in (3,3x10 ⁶)	R 33	18	18	16	10	7	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	T 33	18	18	18	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
St.p.in (3,3x10 ⁴)	R 34	18	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	T 34	18	18	18	16	11	11	11	8	6	5	5	5	5	5	5	5	5
Kp.AL (4x10 ⁸)	R 35	20	20	20	14	12	7	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	T 35	20	20	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kp.AL (8x10 ⁷)	R 36	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19
	T 36	20	20	20	17	12	12	10	10	8	8	7	6	5	5	5	5	5

TABLEAU VI: - Etude comparative du nombre d'animaux survivants après stimulation par voie intra-nasale (R), ou non (T), en fonction du temps et du type d'épreuve.
(* significatif $\alpha = 5\%$, ** significatif $\alpha = 1\%$).

TYPE D'ÉPREUVES	LOTS D'ANIMAUX	Animaux survivants, f (t)																
		J0 J1 J2 J3 J4 J5	J6 J7 J8 J9 J10	J11 J12 J13 J14 J15	J20													
VG.AL (1/50)	R 41	20 20 20 19 19 17	11 5 2 1 1	0 0 0 0 0	0													
	T 41	20 20 20 20 20 18	8 3 2 1 1	0 0 0 0 0	0													
VG.AL (1/200)	R 42	19 19 19 19 19 19	18 18 18 18 18	18 18 18 18 18	18													
	T 42	20 20 20 20 20 20	20 20 20 20 20	20 20 20 20 20	20													
St.p.in (1,2x10 ⁵)	R 43	11 11 11 6 5 3	3 3 3 3 3	3 3 3 3 3	3													
	T 43	11 11 10 6 4 4	3 3 3 3 2	2 1 1 1 1	1													
St.p.in (1,2x10 ⁴)	R 44	16 16 15 15 8 7	7 7 7 7 7	7 7 7 7 7	7													
	T 44	16 16 16 16 14 14	13 11 11 10 9	9 7 7 5 5	3													
Kp.AL (4x10 ⁸)	R 45	20 20 19 19 17 16	14 14 13 13 13	13 13 13 13 13	13													
	T 45	20 20 19 19 18 15	8 6 4 3 2	1 1 1 1 1	1													
Kp.AL (8x10 ⁷)	R 46	17 17 17 17 15 15	15 15 14 14 13	13 13 13 13 12	12													
	T 46	19 19 19 19 19 18	17 17 17 17 17	16 16 16 16 16	15													

TABLEAU VII : - Etude comparative du nombre d'animaux survivants, après stimulation par voie orale (R) ou non (T), en fonction du temps et du type d'épreuve.

VOIES D'INOCULATION		PROTECTION f (CHALLENGES)				
D E L'IMMUNOSTIMULANT		VG.AL	St.p.in		Kp.AL	Kp.ip.
AERIEENNE	aérosol liquide	R = 80% T = 0% (80%) (+++)	R = 10% T = 15% (-5%) (0)	R = 75% T = 15% (60%) (++)	R = 0% T = 5% (-5%) (0)	
	aérosol poudre	R = 85% T = 30% (55%) (+++)	R = 35% T = 15% (20%) (+)	R = 50% T = 50% (0%) (0)	R = 50% T = 25% (25%) (+)	
INTRA-NASALE		R = 90% T = 15% (75%) (+++)	R = 94% T = 27% (67%) (+++)	R = 95% T = 25% (70%) (+++)		
DIGESTIVE		R = 0% T = 5% (-5%) (0)	R = 43% T = 18% (25%) (+)	R = 65% T = 5% (60%) (+++)		

TABLEAU VIII: - Pourcentages de survie des animaux, 20 j. après le challenge, stimulés par différentes voies, et éprouvés par différents germes.

R : animaux stimulés,
T : animaux témoins.

(le chiffre entre parenthèses représente la différence de pourcentage de survie entre R et T à J+20).

(+++): significatif à 1% - (0) : aucun effet

(+) : retard de mortalité non significatif

(++) : significatif à 5 %

D / Après inoculation par voie intra-nasale.

L'E P S administré par voie intra-nasale protège de manière significative contre Myxovirus influenzae et Klebsiella pneumoniae en aérosol, Streptococcus pyogenes i. n., mais non contre Klebsiella pneumoniae injecté par voie i. p.. (tableau VI) .

E / Après inoculation par voie orale.

L'E P S administré par voie digestive protège de manière significative contre Klebsiella pneumoniae par aérosol. Dans tous les autres types d'épreuves utilisés, on ne note aucune protection significative (tableau VII) .

II - ETUDE GRANULOMETRIQUE COMPARATIVE DES AEROSOLS
LIQUIDE ET SOLIDE D'E P S.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux IX et X.

Nous pouvons remarquer que le nombre de particules totales est voisin dans les deux types d'aérosols, ce qui est normal, étant donné le type de régulation, qui porte sur le nombre de particules en suspension dans l'air. Le bon fonctionnement du dispositif utilisé est confirmé par des écarts-types très faibles. La concentration la plus grande en particules se situe dans les deux cas, entre 1,4 et 3 μ .

Cependant, le volume de l'aérosol poudre (volume théorique occupé par les particules totales) est nettement supérieur au volume de l'aérosol liquide, ce qui est normal étant données les répartitions différentes des gammes granulométriques dans les deux types d'aérosols: la proportion de grosses particules de 5 à 10 μ est beaucoup plus importante dans l'aérosol poudre et pratiquement elle seule détermine la différence entre les volumes des deux aérosols.

I.- DIAMETRES DE L'AEROSOL POUDRE

CANAUX EXPLORES

Particules totales (x10 ⁶ /0,1 ft ³)	0,5 - 0,7 μ	0,7 - 1,4 μ	1,4 - 3 μ	3 - 5 μ	5 - 10 μ
$\bar{x}$ = 191,990	15,00 %	16,34 %	45,88 %	7,95 %	14,82 %
σ = 2,230	0,62	5,01	4,19	0,25	1,28
Valeurs extrêmes 189,349	14,24	10,16	39,63	7,60	13,28
193,446	15,72	23,17	50,53	8,21	16,45

II.- VALEURS VOLUMIQUES DE L'AEROSOL POUDRE

CANAUX EXPLORES

Particules totales (x10 ⁶ /0,1 ft ³)	0,5 - 0,7 μ	0,7 - 1,4 μ	1,4 - 3 μ	3 - 5 μ	5 - 10 μ
$\bar{x}$ = 7292,562 μ^3	3,247 x 10 ⁶ μ^3	19,004 x 10 ⁶ μ^3	489,414 x 10 ⁶ μ^3	510,569 x 10 ⁶ μ^3	6270,328 x 10 ⁶ μ^3
σ = 535,164	0,154	5,959	41,910	13,100	497,992
%	0,044	0,26	6,71	7,00	85,98
Valeurs extrêmes 6625,555	3,074	11,658	427,011	492,660	5674,582
7673,973	3,436	27,865	532,926	523,072	6651,161

TABLEAU IX : - Résultats de l'étude granulométrique avec l'aérosol POUDRE.

I.- DIAMETRES DE L'AEROSOL LIQUIDE						
Particules totales (x10 ⁶ /0,1 ft ³)	CANAUX EXPLORES					
	0,5 - 0,7 μ	0,7 - 1,4 μ	1,4 - 3 μ	3 - 5 μ	5 - 10 μ	
$\bar{x}$ = 188,085	17,06 %	21,59	40,58	12,83		7,92
σ = 1,751	0,95	3,79	3,56	0,11		1,08
Valeurs extrêmes 185,444	16,09	17,39	35,07	12,62		6,26
190,659	18,45	27,61	44,44	12,99		9,05

II.- VALEURS VOLUMIQUES DE L'AEROSOL LIQUIDE

Particules totales (x10 ⁶ /0,1 ft ³)	CANAUX EXPLORES					
	0,5 - 0,7 μ	0,7 - 1,4 μ	1,4 - 3 μ	3 - 5 μ	5 - 10 μ	
$\bar{x}$ = 4523,919 μ^3	3,627 x 10 ⁶ μ^3	24,449 x 10 ⁶ μ^3	424,841 x 10 ⁶ μ^3	808,936 x 10 ⁶ μ^3	3262,666 x 10 ⁶ μ^3	
σ = 431,991	0,233	4,391	33,690	6,352	405,959	
%	0,08	0,54	9,39	17,88	72,10	
Valeurs extrêmes 3839,968	3,382	19,648	371,368	799,098	2628,842	
5032,945	3,963	29,786	461,513	811,504	3737,878	

TABLEAU X : - Résultats de l'étude granulométrique avec l'aérosol LIQUIDE.

III - ETUDE DE L'IMMUNOSTIMULATION AU NIVEAU CELLULAIRE.

A / Technique des plages d'hémolyse directe (P F C).

Nous avons calculé, pour chaque lot, le nombre de cellules mononucléées recueillies par rate (effet réticulo stimulant) et le nombre de cellules produisant des plages de lyse directe (effet immunostimulant) pour 10^6 cellules et par rate.

Les résultats sont consignés dans le tableau XI et les figures 5 et 6 .

On remarque que l'E P S a un fort pouvoir immunostimulant.

B / Test de l'épuration du carbone colloïdal.

1°) Injection sous-cutanée d'E P S.

Lots d'animaux	Type de stimulat.	φ	Ecart-type	Variance	t de Student
Témoins		4,2	0,62	0,385	
EPS (SC1)	1 inj.SC	4,54	0,67	0,451	1,04 non significatif.
EPS (SC2)	2 inj.SC	4,98	0,59	0,348	2,43 signif. à 95%

Deux injections sous-cutanées d'E P S de 100 g chacune entraînent un accroissement significatif à 95 % de l'indice phagocytaire corrigé (φ).

Lots d'animaux.	J + 17 (3 jours après GRM)			J + 18 (4 jours après GRM)			J + 19 (5 jours après GRM)		
	Nb. de cellules /rate ⁶ X 10 ⁶	Nb. de cellules produisant des plages de lyse		Nb. de cellules /rate ⁶ X 10 ⁶	Nb. de cellules produisant des plages de lyse		Nb. de cellules /rate ⁶ X 10 ⁶	Nb. de cellules produisant des plages de lyse	
		Pour 10 ⁶ cellules	Par rate		Pour 10 ⁶ cellules	par rate		Pour 10 ⁶ cellules	par rate
Témoins absolus	58	0	0	86	0	0	80	0	0
Témoins E P S	72	0	0	73	0	0	93	0	0
Témoins G R M	102	87	8874	115	232	26 680	103	212	21 836
Traités E P S	156	83	12 948	150	1083	151 620	136	269	36 584

TABLEAU XI : Etude des effets immunoréticulant et immunostimulant de l'E P S , à l'aide du test "P F C".

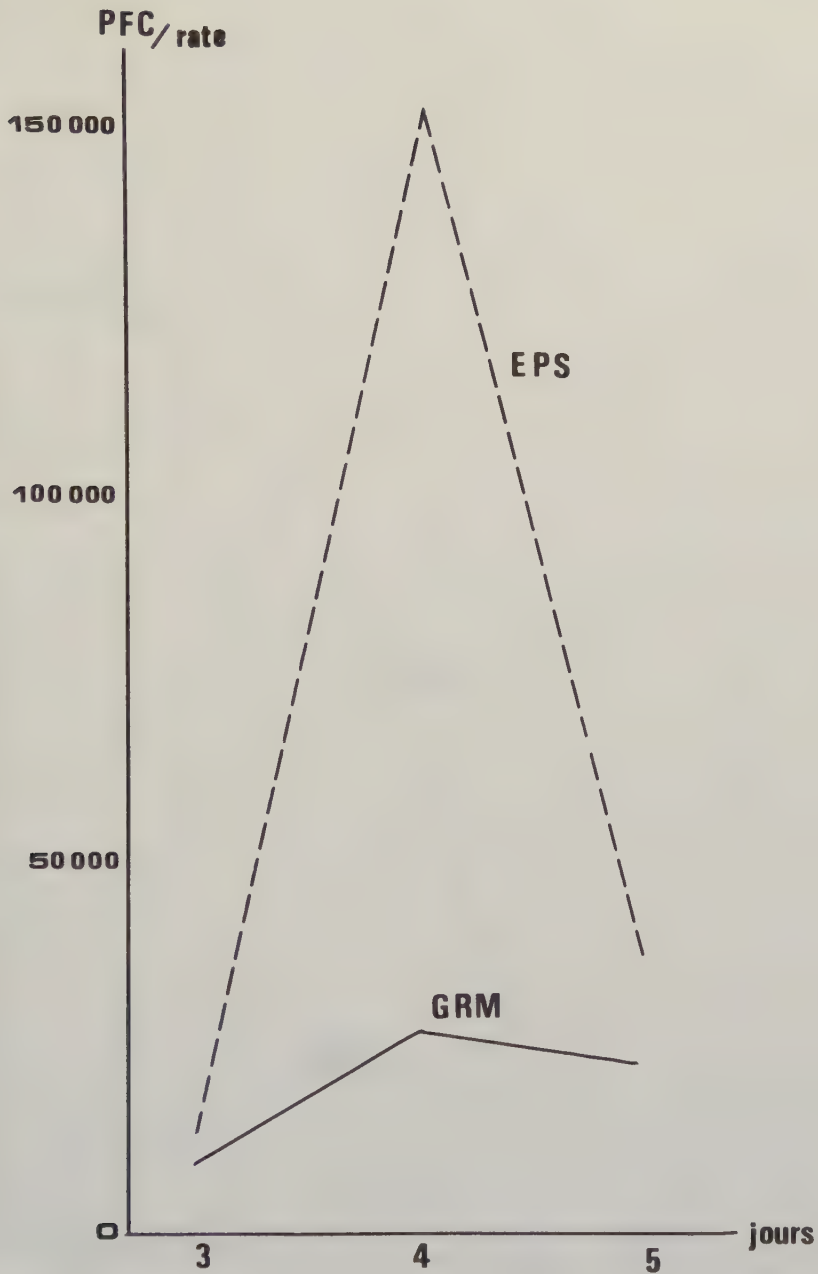


FIGURE 5 : Effet immunostimulant de l' E.P.S.
-Nombre de plages de lyse par rate.

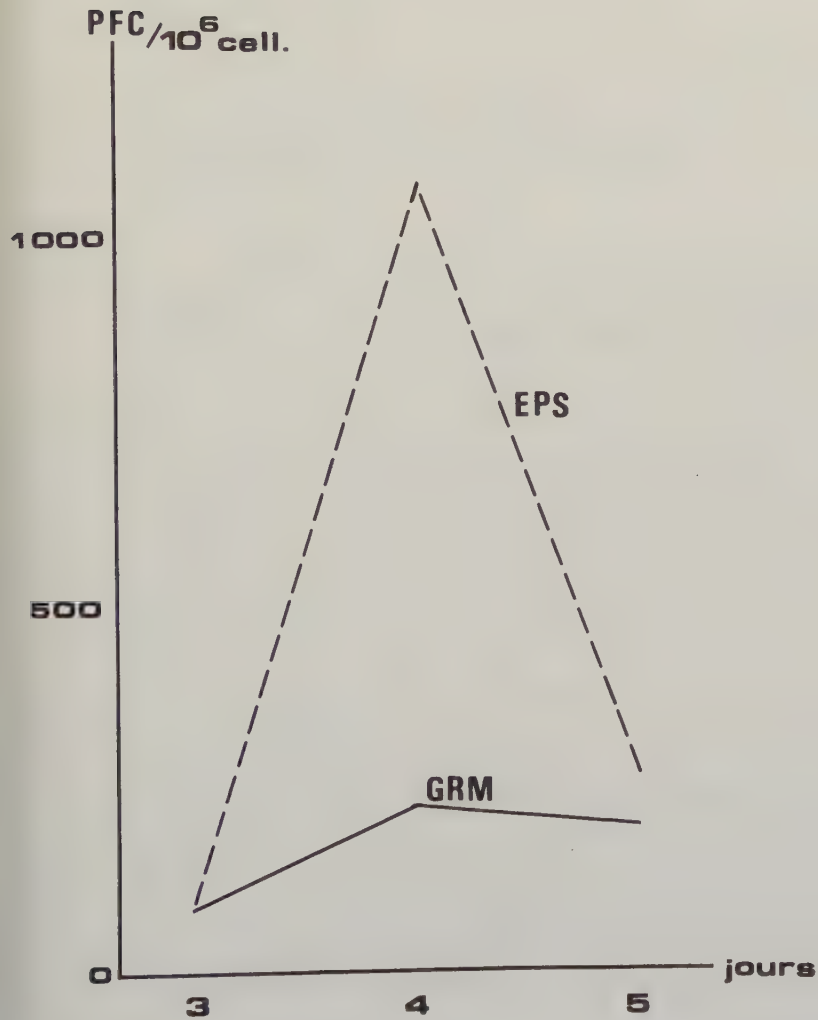


FIGURE 6 : Effet immunostimulant de l'E.P.S.

-Nombre de plages de lyse pour 10^6 cellules.

2°) Administration d'E P S par voie orale:

Lots d'animaux	φ	Ecart-type.	Variance	t de Student
Témoins	4,10	0,515	0,265	3,43 significatif à 99%
EPS (VO)	4,66	0,314	0,098	

L'administration d'E P S par voie orale, cinq jours de suite, entraîne une augmentation significative à 99 % de l'indice phagocytaire corrigé (φ).

C / Test d'inhibition de la migration des macrophages.

Méthode d'étude	Pesée des calques		Dosage des protéines				Planimétrie	
			extracellul.		intracell.			
	T	S	T	S	T	S	T	S
$\bar{X}$	0,396	0,384	17,5	18,4	1,13	1,31	61,29	6079
σ	0,054	0,088	0,63	1,3	0,17	0,10	6,91	10,89
σ^2	0,029	0,078	0,39	1,7	0,029	0,01	47,7	117,9
t de Student	0,23		1,15		ϵ		0,9	
% I M M	3						0,8	

T = témoins

S = stimulés par l'E P S.

Il est convenu d'admettre que le pourcentage d'inhibition de la migration des macrophages doit être supérieur ou égal à 20 % pour que le test soit considéré comme positif. D'après les valeurs trouvées, on peut en conclure que l'E P S n'entraîne aucune inhibition significative de la migration des macrophages.

D / Etude de la stimulation de l'activité phagocy-
taire des macrophages alvéolaires.

Temps	Témoin Kp	T ₁	T ₂	E ₁	E ₂	E ₃
T ₀	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
T 1h30	$1,5 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^6$
T 3h	$2 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$
T 4h30	10^8	$8,3 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$
T 6h	$3,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$

E₁, E₂, E₃ = macrophages d'animaux traités par l'EPS,

T₁, T₂ = macrophages d'animaux témoins, non traités
par l'EPS.

Les résultats sont donnés en nombre de germes par ml
de surnageant.

Ce tableau montre que l'activité phagocytaire des ma-
crophages alvéolaires de cobayes n'est pas augmentée après
traitement des animaux par l'EPS.

E / Etude de l'activité enzymatique des macrophages
alvéolaires de cobayes après administration d'EPS.

Lots d'animaux	Taux de phosphatase acide (en ng de phé- nol libérés/mn /10 ⁶ macrophages.	Taux de N-acétyl- D glucosaminidase en g de nitrophénol libérés/mn/10 ⁶ macro.
T ₁	86	15,2
T ₂	0	5,8
T ₃	81	9,9
E ₁	163	12,2
E ₂	148	8,6
E ₃	34	4,1
E ₄	173	5,8

T₁, T₂, T₃ = animaux témoins,

E₁, E₂, E₃, E₄ = animaux traités par l'EPS.

On remarque, dans ce tableau, une augmentation quasi-générale du taux de phosphatase acide chez les animaux traités. (la valeur obtenue avec le lot E₃ semble trop aberrante pour être retenue).

En revanche, les valeurs de N-acétyl- β D-glucosa-minidase obtenues permettent de conclure à une absence de stimulation de cette enzyme.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION.

Pour étudier le pouvoir immunostimulant non spécifique d'une substance, il est nécessaire, d'abord, de rechercher son pouvoir protecteur, ensuite, de considérer son mode d'action au niveau cellulaire.

L'extrait phénosoluble de *Neisseria meningitidis* a montré, vis-à-vis de ces deux critères, un pouvoir immunostimulant certain.

En ce qui concerne le pouvoir protecteur, les résultats obtenus (tableau VIII) varient avec la voie d'inoculation et la nature de l'épreuve. Ainsi l'EPS inoculé par voie aérienne protège contre un virus (*Myxovirus influenzae*), mais aussi contre une bactérie (*Klebsiella pneumoniae*) lorsqu'il est administré sous forme d'aérosol liquide ou par voie intra-nasale. L'EPS semble donc provoquer une stimulation des défenses immunitaires locales. Cependant quand le produit est inhalé sous forme d'aérosol poudre, il n'est pas possible de protéger l'animal contre *K. pneumoniae*. Pour tenter d'expliquer ce résultat, nous avons dû considérer la granulométrie des deux types d'aérosols utilisés (tableaux IX et X). L'aérosol poudre est très riche en grosses particules. En conséquence, on peut penser que la dose pratique inhalée (DPI) est très inférieure à la dose théorique inhalée (DTI), ce qui revient à dire que pour une même DTI, la DPI de l'aérosol liquide est certainement supérieure à celle de l'aérosol poudre. La DPI de cet aérosol serait donc insuffisante pour stimuler efficacement les défenses immunitaires contre *K. pneumoniae*.

Cette hypothèse est confirmée par l'expérimentation. En effet, l'aérosol poudre, dont la concentration particulière dans le caisson est auto-régulée, consomme plus de produit que l'aérosol liquide; la pression du générateur provoque, dans le premier cas, une coalescence des particules sèches, qui sédimentent rapidement. En revanche, lorsque l'aérosol est sous forme liquide, la coalescence porte sur des particules très fines, qui restent plus longtemps en suspension dans le caisson, donc potentiellement inhalables.

Enfin, nous remarquerons que la voie intra-nasale, qui correspond pour une part à la voie aérosol, entraîne une bonne protection contre les trois épreuves par voie aérienne.

Quand ce produit est inoculé par voie orale, on obtient également une protection vis-à-vis de *K. pneumoniae* inhalée. On peut donc penser, sachant que la voie aérosol peut entraîner une déglutition partielle des produits, infectieux ou protecteurs, que dans ce cas il existe également un phénomène local de défense, auquel peut être adjoint un mécanisme général.

Si on essaie d'expliquer ces phénomènes en considérant la réponse cellulaire, on remarque une augmentation importante du nombre des plages de lyse spléniques, après stimulation par voie orale. Nous pouvons donc en déduire que l'EPS stimule de manière significative la production d'Ig M par les lymphocytes B.

De plus, ce produit, après deux injections sous-cutanées, accélère la vitesse d'élimination du carbone colloïdal, l'élimination étant encore plus importante si l'inoculation a lieu par voie orale. L'EPS stimule donc le pouvoir phagocytaire des cellules de Küpffer et des macrophages du foie et de la rate. Rappelons cependant que cette méthode ne rend compte que de la faculté d'ingestion du macrophage, et non pas de sa capacité de digestion (donc de destruction).

Par contre, le produit, déposé sur la muqueuse nasale, ne modifie pas le pouvoir phagocytaire des macrophages alvéolaires de cobaye pour *K. pneumoniae*. Or il existe une augmentation significative du taux de phosphatase acide de ces macrophages. On doit donc admettre le rôle primordial de la voie d'administration. Quand le produit est inoculé par voie intra-nasale, une fraction seulement pénètre jusqu'aux poumons, fraction suffisante pour que le test chimique, très sensible, soit positif, mais insuffisante pour que le test fonctionnel, moins sensible mette en évidence une stimulation significative.

Les résultats négatifs obtenus au niveau du MIF tra-

duisent une absence de stimulation de la sécrétion de cette lymphokine au niveau des lymphocytes T .

Malgré ce résultat négatif, on peut conclure, d'après les tests cellulaires, que l'EPS produit une stimulation générale du système immunitaire, en particulier quand il est administré par voie orale.

CONCLUSIONS

Une étude de l'efficacité des immunostimulants en fonction des voies d'inoculation et du type d'épreuve a été entreprise en prenant comme modèle un extrait phénolosoluble de *Neisseria meningitidis*.

Les résultats obtenus ont montré que le produit, inoculé par voie aérienne sous forme d'aérosol, ou déposé sur la muqueuse nasale, provoque la stimulation des défenses locales. Quand l'extrait phénolosoluble de *Neisseria meningitidis* est administré par voie orale, il existe en plus un effet immunostimulant général.

Après administration par voie orale, l'utilisation de tests d'immunité cellulaire (plages de lyse spléniques, épuration du carbone colloïdal) a confirmé le rôle de l'immunostimulation générale dans ces mécanismes de défense.

Vu :

LE DIRECTEUR

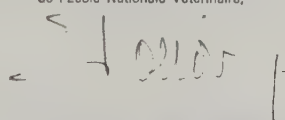
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,



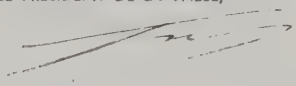
Vu :

LE DOYEN,

LE PROFESSEUR RESPONSABLE
de l'École Nationale Vétérinaire,



LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,



Vu et permis d'imprimer

LYON, le

6 DEC. 1979

19

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ

LYON I



BIBLIOGRAPHIE.

- 1-ADAM A., CIORBARU R., PETIT J.F., LEDERER E.-Isolation and properties of a macromolecular water-soluble immunoadjuvant fraction from the cell wall of Mycobacterium smegmatis.
-Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 1972, 69 (851-854).
- 2-APICELLA M.A. and ROBINSON J.A.-Physico-chemical properties of Neisseria meningitidis group C and Y polysaccharide antigens.
-Infect. Immunity, 1970, 2 (392-397).
- 3-APICELLA and ROBINSON J.A. -Physico-chemical properties of Neisseria meningitidis group X polysaccharide antigens.
-Infect. Immunity, 1972, 6 (773-778).
- 4-ARTENSTEIN M.S., GOLD R., ZIMMERLY J.G., WYLE F.A., SCHNEIDER H. and HARKINS C.-Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine.
-New Engl. J. Med., 1970, 282 (417-420).
- 5-ARTENSTEIN M.S., GOLD R., ZIMMERLY J.G., WYLE F.A., BRANCHE W.C. Jr. and HARKINS C.-Cutaneous reactions and antibody response to meningococcal group C polysaccharide vaccines in man.
-J. Infect. Dis., 1970, 121 (372-377).
- 6-ARTENSTEIN M.S., BRANDT B.L., TRAMONT E.C., BRANCHE W.C. Jr. FLEET H.D. and COHEN R.L.-Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination.
-J. Infect. Dis., 1971, 124 (277-278).
- 7-ARTENSTEIN M.S., BRANCHE W.C. Jr., ZIMMERLY J.G., COHEN R.L. TRAMONT E.C., KASPER D.L. and HARKINS C.-Meningococcal infections: 3 studies of group A polysaccharide vaccine.
-Bull. W.H.O., 1971, 45 (283-286).
- 8-ARTENSTEIN M.S.-Meningococcal infections: 5-duration of polysaccharide vaccine induced antibody.
-Bull. W.H.O., 1971.
- 9-BAKER L.A., CAMPBELL P.A.-Listeria monocytogenes cell walls induce decreased resistance to infection.
-Infect. Immunity, 1978, 20 (99-107).

- 10-BEKIERKUNST A.,SULITZEANU D.-Induced resistance of mice to infection with Brucella abortus 2308 through vaccination with BCG.
Nature(LOND.),1958,182, (883-884).
- 11-BEKIERKUNST A.,LEVIS I.S.,YARKONI E.,VILKAS E.,LEDERER E.-
Cellular reaction in the footpad and draining lymph-nodes of mice induced by mycobacterial fractions and BCG bacilli.
-Infect. Immunity,1971,4, (245-255).
- 12-BHATTACHARJEE A.K.,JENNINGS H.J.,KENNY C.P.,MARTIN A.,
SMITH I.C.P.-Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of Neisseria meningitis serogroup B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance
J. Biol. Chem.,1975,50, (1926-1932).
- 13-BIOZZI G.,BENACERRAF B.,STIFFEL G C.,andHALPERN B.-
Etude quantitative de l'activité granulopexique du S.R.E. chez la souris.
-C.R. Soc. Biol.,1954,148, (431-435).
- 14-BIOZZI G.,BENACERRAF B.,and HALPERN B.-Quantitative study of granuloplectic activity of R.E.S.-2.A study of the kinetics of the granuloplectic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relation between the weight of the organs and their activity.
-Brit. J. Exp. Path.,1953,34, (441-457).
- 15-BLACKLOW R.S. and WARREN L.-Biosynthesis of sialic acids by Neisseria meningitidis.
-J. Biol. Chem.,237 (3 520-3 526).
- 16-BLOOM B.R. and BENNET B.-Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type Hypersensitivity.
-Sci.,1966,153 (80-82).
- 17-BONA C.,DAMAIS C.,DIMITRIU A.,CHEDID L.,CIORBARU R.,
ADAM A.,PETIT J.F.,LEDERER E.,ROSSELET J.P.-Mitogenic effect of a water soluble extract of Nocardia opaca: a comparative study with some bacterial adjuvants of spleen and peripheral lymphocytes of four mammalian species.
-J. Immunol.,1974,112 (2 028-2 035).
- 18-BOURDON J.L.-Etude bactériologique de Neisseria gonorrhoeae.
-La revue de médecine,1979,20 (558-560).
- 19-BRANDT B.L.,WYLE F.A.,ARTENSTEIN M.S. -A radioactive antigen-binding assay for Neisseria meningitidis polysaccharide antibody.
-J. Immunol.,1972,108 (913-920).

- 20-CATLIN B.W. -Transfer of the organism name *Neisseria catarrhalis* to *Branhamella* gen.nnov.
-Int. J. Syst. Bact., 1970, 20 (155-159).
- 21-CHEDID L.-Biological activities of detoxified bacterial lipopolysaccharides.
-Bull. Inst. Pasteur, 1976, 74 (103-105).
- 22-CHEDID L., PARANT M., PARANT F., LEFRANCIER P., CHOAY J., LEDERER E.-Enhancement of non specific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immuno-adjuvant (N. acetylmuramyl L alanyl D Isoglutamine) and several analogs.
-Proc. Natl. Acad. Sc.USA, 1977, 74 (2 089-2 093).
- 23-CLUFF L.C.-Effets of lipopolysaccharides (endotoxins) on susceptibility to infections.
J. Infect. Dis., 1970, 122 (205-215).
- 24-CONTENT Y. -Contribution à l'étude de l'immunostimulation non spécifique à l'aide d'extraits bactériens.
-Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 1976.
- 25-CREACH O. -Contribution à l'étude des propriétés biologiques de lipides constitutifs de l'endotoxine d'*Eberthella typhi*.
-Thèse de doctorat en pharmacie, Lyon, 1966.
- 26-CUNNINGHAM A.J., SZENBERG A.-Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells.
-Immunology, 1968, 14 (599-600).
- 27-DAVID J.R., ALASKARI S., LAWRENCE H.S. and THOMAS L.-Delayed hypersensitivity in vitro. The specificity of hapten protein conjugate in the inhibition of cell migration.
-J. Immunol., 1964, 93 (279-282).
- 28-DAVIS C.E. and ARNOLD K.-Rôle of meningococcal endotoxin in meningococcal purpura.
-J. Exp. Med., 1974, 140 (159-171).
- 29-DIMITROV, NICOLAY V., ANDRE S., ELIOPOULOS G., HALPERN B. Effect of *Corynebacterium parvum* on bone marrow cell cultures.
-Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1975, 148 (440-442).
- 30-DRESSER D.W. and PHILLIPS J.M.-The orientation of the adjuvant activities of *Salmonella typhosa* lipopolysaccharide and lentinan.
-Immunology, 1974, 27 (895-902).
- 31-DRESSER D.W., TAO T.W.-The potentiation of B cell immunity and the suppression of T cell help by pertussis vaccine.
-Immunology, 1975, 28 (443-450).

- 32-DUBOS R.J., SCHAEGLER R.W., -Effects of cellular constituents of mycobacteria on the resistance of mice to heterologous infection. I.-Protective effects.
-J. Exp. Med., 1957, 106 (703-726).
- 33-ERWA H.H., HASEEB M.A., IDRIS A.A., LAPEYSSONNIE L., SANBORN W. and SIPPET J.E. -A serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine: studies in the Sudan to combat cerebrospinal meningitis caused by *Neisseria meningitidis* group A.
-Bull. WHO, 1973, 49 (301-305).
- 34-EVANS D.G. -Detection of antibody producing cells of mice injected with antigens of *Neisseria meningitidis*.
-Infect. Immunity, 1970, 1 (151-156).
- 35-FAUVE R.M., BOUANCHAUD D., DELAUNAY A. -Degrés de résistance comparés offerts in vitro par des macrophages provenant de souris normales ou vaccinées à l'infection par *Listeria monocytogenes* ou *Corynebacterium hutscheri*.
-C.R. Acad. Sc. Paris, 1964, 259 (953-955).
- 36-FAUVE R. M., BOUANCHAUD D., DELAUNAY A. -Résistance cellulaire à l'infection bactérienne. IV-Immunisation active et résistance du macrophage de souris NCS à la multiplication intracellulaire de *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium hutscheri* et *Brucella melitensis*.
-Ann. Inst. Pasteur, 1966, 110 (106-117).
- 37-FAUVE R. M., HEVIN M.B. -Pouvoir bactéricide des macrophages spléniques et hépatiques de souris envers *Listeria monocytogenes*.
-Ann. Inst. Pasteur, 1971, 120 (399-411).
- 38-FAUVE R.M., HEVIN M.B. -Immunostimulation with bacterial phospholipid extracts.
-Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 1974, 71 (573-577).
- 39-FINGER H., HOF M., ELEKES E. and PLAGER L. -Adjuvant activity of *Bordetella pertussis* in New-Zealand mice.
-Z. Immunitätsforsch Exp. Klin. Immunol., 1974, 147 (437-440)
- 40-FONTANGES R., FOURNIER J.M. -L'immunostimulation par aérosol I. Technologie de la vaccination.
-Lyon pharmaceutique, 1974, 25 (9-31).
- 41-FLOC'H F., WERNER G.H. -Increased resistance to virus infection of mice inoculated with BCG.
-Ann. Inst. Pasteur, 1976, 127 (173-186).
- 42-FRASCH C.E. and CHAPMAN S.S. -Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. I- Serological typing by a microbactericidal method.
-Infect. Immunity, 1972, 5 (98-102).
- 43-FRASCH C.E. and CHAPMAN S.S. -Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. II- Extraction of type specific antigens for serotyping by precipitation techniques.
-Infect. Immunity, 1972, 6 (127-133).

- 44-FRASCH C.E. and CHAPMAN S.S.-Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. III-Application of a new bactericidal inhibition technique.
-J. Infect. Dis., 1973, 127 (149-154).
- 45-FRASCH C.E. and CHAPMAN S.S. -Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. IV-Preliminary chemical studies on the nature of the serotype antigen.
-Infect. Immunity, 1972, 6 (674,681).
- 46-FRASCH C.E. and GOTSCHLICH E.C. -An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* responsible for serotype specificity.
-J. Exper. Med., 1974, 140 (87-104).
- 47-FREUND J., CASALS J., HOSMER E.P. -Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil.
-Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1937, (509-513).
- 48-FREUND J. -The mode of action of immunologic adjuvants.
-Fortschr. Tubercul. Forsch., 1956, 7 (130-148).
- 49-GALDIERO F., ROMAND C. -The protection of mice against experimental infection by means of immunization with enriched membrane fraction of *Salmonella typhimurium*.
-Experimentia, 1975, 51 (238).
- 50-GEORGE M., VAUGHAN J.H. -In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity.
-Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1963, 111 (514-521).
- 51-GLASGOW L.A., CRANE J.L., SCHLEUPNER C.J., KERN E.R., YOUNGNER J.S., FEINGOLD D.S. -Enhancement of resistance to murine osteogenic sarcoma in vivo by an extract of *Brucella abortus* (Bruc. Pel.): association with activation of reticuloendothelial system macrophages.
-Infect. Immunity, 1979, 23 (19-26).
- 52-GOLD R. and ARTENSTEIN M.S. -Meningococcal infection. 2. Field trial of group C meningococcal polysaccharide, 1969-1970.
Bull. WHO, 1971, 45 (279-282).
- 53-GOLD R., WYLE F.R. -New classification of *Neisseria meningitidis* by means of bactericidal reactions.
-Infect. Immunity, 1970, 1 (479-484).
- 54-GOLD R., WINKELHAKE J.L., MARS R.S., ARTENSTEIN M.S. -Identification of an epidemic strain of group C *Neisseria meningitidis* by bactericidal serotyping.
-J. Infect. Dis., 1971, 124 (593-597).
- 55-GOLDSCHNEIDER I., GOTSCHLICH E.C., ARTENSTEIN M.S. -Human immunity to the meningococcus. I. -The role of humoral antibodies.
-J. Exp. Med., 1969 (1 307-1 326)

- 56-GOLDSCHNEIDER I.,GOTSCHLICH E.C.,ARTENSTEIN M.S.-Human immunity to the meningococcus.II.-Development of natural immunity.
-J. Exp. Med.,1969 (1327-1348).
- 57-GOTSCHLICH E.C.,LIU T.Y.,and ARTENSTEIN M.S.-Human immunity to the meningococcus.III.-Preparation and immunological properties of the group A,group B and group C meningococcal polysaccharides.
-J. Exp. Med.,1969 (1349-1366).
- 58-GOTSCHLICH E.C.,GOLDSCHNEIDER I. and ARTENSTEIN M.S.-Human immunity to the meningococcus.-IV-Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharide in human volunteers.
-J. Exp. Med.,1969, 129 (1367-1384).
- 59-GREENBERG L. and COOPER M.W. -A somatic antigen vaccine for the prevention of meningococcal cerebro-spinal meningitis.
-Bull. WHO,1965, 33 (21-26).
- 60-GUMBINER C.,PATERSON P.Y.,YOUNG G.P.,YOUNG A.S.-Adjuvancy of mycobacterial RNA and Poly A:U for introduction of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs.
-J. Immunol.,1973,110 (309-312).
- 61-GUYTON A.C. -Measurement of the respiratory volume of laboratory animals.
-Am. J. Physiol.,1947,150 (70-77).
- 62-HALPERN B.,PREVOT A.R.,BIOZZI G.,STIFFEL C.,MOUTON D.,MORARD J.C.,BOUTHILLIER Y.,DECREUSEFOND C.- Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*.
J. Réticuloendothel. Soc.,1964, 1 (77).
- 63-HALPERN B.,BIOZZI G.,STIFFEL C.,MOUTON D.- Inhibition of tumour growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*.
-Nature,1966,212 (853-854).
- 64-HALPERN B. -*Corynebacterium parvum*:an immunomodulator. -Recent results in cancer research,1974,47 (262-271).
- 65-HALPERN B. - *Corynebacterium*:applications in experimental and clinical oncology.
-Proceedings of the first International Conference Paris-France,1974.
- 66-HILL J.C.,PETERSON N.R. and WEISS E. -Characterization of spheroplast membranes of *Neisseria meningitidis* group B.
-Infect. Immunity,1972, 5 (612-621).
- 67-HILL J.C. and WEISS E. -Protein fraction with immunogenic potential and low toxicity from the cell wall of *Neisseria meningitidis* group B.
-Infect. Immunity,1974,10 (605-615).

- 68-HOWARD J.G., ROWLEY D., WARDLAW A.C. -Stimulation of non-specific immunity by the lipid A component of bacterial lipopolysaccharide.
Nature, 1957, 179 (314-315).
- 69-HOWARD J.G., BIOZZI G., HALPERN B., STIFFEL C., MOUTON D.-
The effect of Mycobacterium tuberculosis (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxin and Salmonella enteridis.
-Brit. J. Exp. Path., 1959, 40 (281-290).
- 70-HOWARD J.G., CHRISTIE G.H., SCOTT M.T. -Biological effects of Corynebacterium parvum. IV- Adjuvant and inhibitory properties on B lymphocytes.
-Cell Immunol., 1973, 7 (290-301).
- 71-IVANOFF B. -Evolution des immunoglobines intestinales et sériques de la souris au cours de la vaccination par voie orale.
-Thèse de doctorat d'état en pharmacie- Lyon-1976.
- 72-JACOBS D., YASHPHE D.J., ABRAHAM C. -Stimulation of T cell activity by a methanol extract residue of BCG.
-Recent Results in cancer Research, 1974, 47 (183-195).
- 73-JUY D., CHEDID L. -Comparison between macrophage activation and enhancement of non specific resistance to tumors by mycobacterial immunoadjuvants.
-Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 1975, 72 (4105-4109).
- 74-KABAT E.A., KAISER H. and SIKORSKI H. -Preparation of the type specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness as an antigen in human beings.
-J. Exp. Med., 1945, 80 (299-307).
- 75-KABAT E.A., MILLER C.P., KAISER H. and FOSTER A.Z. -Chemical studies on bacterial agglutination; VII.-A quantitative study of the type specific and group specific antibodies in antimeningococcal sera of various species and their relations to mouse protection.
-J. Exp. Med., 1945, 81 (1-8).
- 76-KASPER P.L., WINKELMAKE J.L., BRANDT B.L. and ARTENSTEIN M.S.
-Antigenic specificity of bactericidal antibodies in antisera to Neisseria meningitidis.
-J. Infect. Dis., 1973, 127 (378-387).
- 77-KASPER D.L., WINKELHAKE J.L., ZOLLINGER W.D., BRANDT B.L. and ARTENSTEIN M.S. -Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of Escherichia coli 07,K1(L:N:M and group B Neisseria meningitidis.
-J. Immunol., 1973, 110 (262-268).
- 78-KATELEY J.R., KASAROV L., FRIEDMAN H. -Modulation of in vivo antibody responses by cholera toxin.
-J. Immunol., 1975, 114 (81-86).
- 79-KIND P.R.N., KING B.J. -Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino antipyrine.
-J. Clin. Path., 1954, 7 (322-326).

- 80-KINGSBURY D.T. -Deoxyribonucleic acid homologies among species of the genus *Neisseria*.
-J. Bact., 1967, 94 870-874).
- 81-KINGSBURY D.T., FANNING G.R., JOHNSON K.E. and BRENNER D.J.
-Thermal stability of interspecies *Neisseria* DNA duplexes.
J. Gen. Microbiol., 1969, 55, (201-208).
- 82-KORDA -La production de particules très fines en génie clinique.
-Chimie et industrie, 1961, 85 (11-22).
- 83-KUPERMAN O., YASHPHE O.J., SHARF S., BEN EFRAIM S., WEISS D.W.
-Non specific stimulation of cellular immunological responsiveness by a Mycobacterial fraction.
-Cell. Immunol., 1972, 3 (277-282).
- 84-LEWIS P.D., LOOMIS D. -Allergic irritability: the formation of antish sheep haemolytic amboreceptor in the normal and tuberculous guinea pig.
-J. Exp. Med., 1924, 40 (503-515).
- 85-LIU T.Y., GOTSCHLICH E.C., DUNNE F.T. and JONSSSEN E.K. -Studies on the meningococcal polysaccharide. II.-Composition and chemical properties of the group A polysaccharide.
-J. Biol. Chem., 1971, 246 (2849-2858).
- 86-LIU T.Y., GOTSCHLICH E.C., DUNNE F.T. and JONSSSEN E.K. -Studies on the meningococcal polysaccharide.-II.-Composition and chemical properties of the group B and group C polysaccharides.
J. Biol. Chem., 1971, 246 (4703-4712).
- 87-LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.I., FARRA L., RANDALL R.J. -Protein measurement with the folin phenol reagent.
-J. Biol. Chem., 1951, 193 (265-275).
- 88-MC GHEE T.R., FARRAR J.J., MICHALER S.M., MERGEN HAGEN S.E. and ROSENSTREICH D.L. -Cellular requirements for lipopolysaccharide adjuvancity. A role for both T lymphocytes and macrophages in vitro responses to particulate antigens.
-J. Exp. Med., 1979, 149 (793-807).
- 89-MACKANESS G.B., LAGRANGE P.H., ISHIBASHI T. -The modifying effect of BCG on the immunological induction of T cells.
J. Exp. Med., 1974, 139 (1540-1552).
- 90-MANDRELL R.E., AND ZOLLINGER W.D. -Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition.
-Infect. Immun., 1977, 16 (471-475).
- 91-MATHE G., AMIEL J.C., SCHWARZENBERG L., HAYAT M., POUILLARD P., SCHNEIDER M., CATTAN A., JASMIN C., BÉL POMME D., SCHLUMBERGER J.R., DE VASSAL F., MUSSET M., MISSET J.L. -Immunothérapie active des leucémies aiguës et des lymphosarcomes leucémiques.
-Nouv. Presse Méd., 1975, 4 (1337-1342).

- 92-MATHEG.,PIALLE-PANNENKO O.,FLORENTIN I.,BRULEY-ROSSET M.,
KAMEL M.,HIU I.J.,BOURUT C. -The second generation of
EORTC-ICIG experimental screening for systemic immunity
adjuvants.Its significance for cancer immunotherapy:a com-
parison of BCG and its hydrosoluble extract.
-Cur. J. Cancer, 1975, 11 (801-807).
- 93-MIGLIORE-SAMOUR D.,KORONTZIS M.,JOLLES P. -Hydrosoluble
immunopotentiating substances extracted from *Corynebacte-*
rium parvum.
Immunol. Comm. 1974 , 3 (593-603).
- 94-MILLER T.E.,MACKANESS G.B.,LAGRANGE P.H. -Immunopotential
with BCG.-II-Modulation of the response to sheep red blood
cells.
-J. Natl. Cancer Inst., 1973, 51 (1669-1676).
- 95-MOTA I.,PERENI A. and TRINDADE V.S. -The mechanism of the
adjuvant effect of *Bordetella pertussis*: the substance
responsible for the selective enhancement of Ig E antibody
production.
-Int. Arch. Allergy appl. Immunol., 1974, 47 (425-432).
- 96-MUNOZ J. -Ef-ect of bacteria and bacterial products on an-
tibody response.
-Adv. Immunol., 1964,4 (397-440).
- 97-NAKASHIMA I.- Adjuvant action of capsular polysaccharide
of *Klebsiella pneumoniae* on antibody response.- I- Inten-
sity of its action.
-J. Immunol., 1972, 108 (1009-1016).
- 98-NAKASHIMA I.,OHTA F.,KOBAYASHI T.,KATO O.,KATO N. -Effect
of antigen doses and time intervals between antigen injec-
tions on secondary,tertiary and quaternary antibody res-
ponses.Establishement of hyperimmunization with bovine
serum albumin in mice treated with capsular polysaccharide
of *Klebsiella pneumoniae*.
-Immunology, 1974 , 26 (443-454).
- 99-NAKASHIMA I.,KATO N. -Non specific stimulation of immuno-
globulin synthesis in mice by capsular polysaccharide of
Klebsiella pneumoniae.
-Immunology, 1974, 27 (179-193).
- 100-PAAKANEN J.- Les lipopolysaccharides de *Neisseria meningi-*
tidis.
-Thèse de doctorat es-sciences -Lyon, 1974.
- 101-PARANT M.,PARANT F.,CHEDID L.,LE MINOR L. -Immunostimulants
bactériens et protection de la souris infectée par *Klebsiella*
pneumoniae résistante aux antibiotiques par mutation ou par
transfert de plasmides.
-Ann. Immunol. Inst. Pasteur, 1975, 126 (319-326).
- 102-PARANT M.,GALELLI A.,PARANT F.,CHEDID L.-Role of B lympho-
cytes in non specific resistance to Kp infection of endo-
toxine treated mice.
-J. Infect. Dis., 1976, 134 (531-539).

- 103-PARANT M., PARANT F., CHEDID L. -Inheritance of lipopoly-saccharide -enhanced non specific resistance to infection and of susceptibility to endotoxic shock in lipopolysaccharide low responder mice.
-Infect. Immunol., 1977, 16 (432-438).
- 104-PARANT M., PARANT F., CHEDID L. -Enhancement of the neonate's non specific immunity to Klebsiella infection by muramyl dipeptide, a synthetic immunoadjuvant.
-Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 1978, 75 (3395-3399).
- 105-PARANT M., AUDIBERT F., PARANT F., CHEDID L., SOLER E., POLONSKY J., LEDERER E. -Non specific immunostimulant activities of synthetic trehalose 6-6' diesters (lower homologs of cord factor).
-Infect. Immunol., 1978, 20 (12-19).
- 106-PETIT J.C., UNANUE E.R. -Effects of bacterial products on lymphocytes and macrophages: their possible role in natural resistance to Listeria infection in mice.
-J. Immunol., 1974 (984-992).
- 107-PILET Ch., SABOLOVIC D. - Brucella abortus et immunothérapie active non spécifique de la tumeur d'Ehrlich.
-Bull. Assoc. Vét. Microbiol., 1970, 7 (43-67).
- 108-PREVOT A.R.
-Ergeb. Mikrobiol., 1960, 33 (6).
- 109-PROST B. - Contribution à l'étude des déterminants antigéniques de Neisseria meningitidis. Les polysides spécifiques de type immunologique.
-Thèse de doctorat en pharmacie -Marseille, 1971.
- 110-RAMON G. -Sur la production des antitoxines.
-C. R. Acad. Sc., 1925, 181 (553-554).
- 111-RAMON G., DJOURICHITCH M. -Recherches expérimentales sur les vaccinations associées.
-Ann. Inst. Pasteur, 1933, 51 (407-418).
- 112-RAYNAUD M., KOUZNETZOVA B., BIZZINI B., CHERMANN J.C. -Etude de l'effet immunostimulant de diverses espèces de Corynebactéries anaérobies et de leurs fractions.
-Ann. Inst. Pasteur, 1972, 122 (695-700).
- 113-ROBERT D. -Etude du macrophage alvéolaire dans la protection contre les infections respiratoires par les ribosomes bactériens.
-Thèse de doctorat de spécialité -Lyon, 1971.
- 114-ROBERTS R.B. -The relationship between group A and group C meningococcal polysaccharides and serum opsonins in man.
-J. Exp. Med., 1970, 131 (499-513).
- 115-ROWLEY D. -Stimulation of natural immunity to Escherichia coli infections. Observations in mice.
-Lancet, 1955, 268 (232-234).
- 116-ROWLEY D. -Rapidly induced changes in the level of non specific immunity in laboratory animals.
-Brit. J. Exp. Path., 1956, 37 (223-234).

- 117-SANBORN W.R., BENCIC T., CVJETANOVIC B., GOTSCHLICH E.C., POLLOCK T.M. and SIPPEL J.E. -Trial of a serogroup A meningococcus polysaccharide vaccine in Nigeria.
-Progr. Immunobiol. Standard, 1972, 5 (497-505).
- 118-SANDBORN W.R. -Meningococcus group A polysaccharide vaccine field trials.
-Table ronde sur l'immunoprophylaxie de la méningite cérébro-spinale. -St Paul de Vence, 12 octobre 1973.
- 119-SCHERP H.W. and RAKE G. -Studies on meningococcal infection.
-XII-Correlation between antipolysaccharide and the antibody which protects mice against infection with type I meningococci.
- J. Exp. Med., 1945, 81 (331-336).
- 120-SCOTT M.T., MARTIN T. -Biological effects of the adjuvant Corynebacterium parvum -II.-Evidence for macrophage -T-cell interaction.
-Cell. Immunol., 1972, 5 (469-479).
- 121-SCOTT M., MARTIN T. -Corynebacterium as a therapeutic antitumor agent in mice.-I- Systemic effects from intravenous injection.
--J. Natl. Cancer Inst., 1975, 53 (855-860).
- 122-SCOTT M.T., MARTIN T. -Corynebacterium as a therapeutic antitumor agent in mice.-II-Local injection.
-J. Natl. Cancer Inst., 1975, 53 (861-865).
- 123-SLJIVIC V.S., WATSON S.R. -The adjuvant effect of Corynebacterium parvum: T-cell dependance of macrophage activation.
-J. Exp. Med., 1977, 145 (45-57).
- 124-THOMAS D.W. and WEISS E. -Response of mice to injection of ribosomal fraction from group B Neisseria meningitidis.
-Infect. Immunity, 1972, 6 (355-363).
- 125-TOUJAS L., DAZORD L., GUELPI J. -Augmentation des propriétés immunostimulantes de Brucella abortus B19 inactivée, par l'utilisation conjuguée d'un antisérum spécifique.
-C. R. Acad. Sc., 1973, 276 (433-436).
- 126-VEDROS N.A., and HILL P.R. -Chemical and antigenic analysis of the cell wall of Neisseria meningitidis group B.
-J. Bactériol., 1966, 91 (1992-1997).
- 127-WAH DAN M.H., RIZH F., EL AKKAO M.A., EL GHOROURY A.A., HABLAS R., GIRGIS N.I., AMER A., BOCTAR W., SIPPLE J.E., GOTSCHLICH E.C., TRIAU R., SANBORN W.R., CVJETANOVIC B. -A controlled field-trial of a serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine.
-Bull. WHO, 1973, 48 (667-673).
- 128-WATSON R.G. and SHERP H.W. -The specific hapten of group C (group IIa) meningococcus.-I-Preparation and immunological behaviour.
-J. Immunol., 1958, 81 (331-336).

- 129-WEISS E. and LONG J.L. -Simplified method for the production of carbohydrate antigen from *Neisseria meningitidis*. -Appl. Microbiol., 1969, 18 (843-847).
- 130-WEISS E. and HILL J.C. -Immunization against *Neisseria* infections. -The Immune System and Infectious Diseases. 4th Int. Convoc. Immunol. -Buffalo, NY, 1974 (423-440).
- 131-WHITE R.G., BERNSTOCK L., JOHNS R.G.S., LEDERER E. -The influence of components of *Mycobacterium tuberculosis* and other Mycobacteria upon antibody production to ovalbumine. -Immunology, 1958, 1 (54-66).
- 132-WYLE F.A., ARTENSTEIN M.S., BRANDT B.L., TRAMONT E.C., KASPER D.L., ALTIERI P.L., BERMAN S.L., LOWENTHAL J.P. -Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. -J. Infect. Dis., 1972, 126 (514-522).
- 133-YOUDIM S., MOSER M., STUTMAN O. -Non specific suppression of tumor growth by an immune reaction to *Listeria monocytogenes*. -J. Natl. Cancer Inst., 1974, 52 (193-198).
- 134-YOUMANS G.P., YOUMANS A.S. -The effect of mycobacterial RNA on the primary response of mice to bovine gamma globulin. -J. Immunol., 1972, 109 (217-221).
- 135-ZOLLINGER W.D., KASPER D.L., VELTRI B.J., ARTENSTEIN M.S. -Isolation and characterization of a native cell complex from *Neisseria meningitidis*. -Infect. Immunity, 1972, 6 (835-851).
- 136-ZOLLINGER W.D., PENNINGTON C.L., ARTENSTEIN M.S. -Human antibody response to three meningococcal outer membrane antigens: comparison by specific hemagglutination assay. -Infect. Immunity, 1974, 5 (975-984).
- 137-ZOLLINGER W.D., MANDRELL R.E. -Outer membran protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid phase radioimmunoassay. -Infect. Immunity, 1977, 2 (424-433).
- 138-ZOLLINGER W.D., MANDRELL R.E., ALTIERI P., BERMAN S., LOWENTHAL J. and ARTENSTEIN M.S. -Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* type 2 protein vaccine in animals and human. -J. Infect. Dis., 1978, 137 (728-739).
-

